

UNIVERZITA KARLOVA

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra Parazitologie**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie



Bc. Anna Brotánková

**Trypanosomy skupiny *T. theileri* u kopytníků v České republice**

**Trypanosomes from the *T. theileri* group in ungulates in the  
Czech Republic**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Jana Brzoňová, Ph.D.

Školitel specialista: doc. Mgr. Milena Svobodová, Dr.

Praha, 2020

**Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

**V Praze dne:**

.....

Anna Brotánková

### **Poděkování**

Chtěla bych zejména poděkovat RNDr. Janě Brzoňové, Ph.D. za poskytnuté vedení, rady a trpělivost při vzniku této práce. Také bych velmi ráda poděkovala doc. Mgr. Mileně Svobodové, Dr. za věnovaný čas a konzultace, které mi poskytla během terénní a laboratorní práce. Poděkování patří také panu prof. RNDr. Ivanu Čepičkovi, Ph.D. za jeho pomoc při tvorbě fylogenetického stromu, prof. RNDr. Petrovi Volfovi, CSc. a Mgr. Karolíně Majerové za poskytnutý hmyz pro mé experimenty. Důležitým partnerem při této práci ať už v laboratoři nebo v terénu byla Mgr. Magdaléna Fialová. Opomenout nemohu ani významnou podporu mého přítele, rodiny a přátel.

## ABSTRAKT

Skupina *Trypanosoma theileri* jsou krevní paraziti kopytníků. Potvrzenými vektory těchto protistů jsou ovádi, v případě *T. melophagium* ovčí kloši, ale detekovány byly tyto trypanosomy také u jeleních klošů, komárů a flebotomů. Na základě předchozích detekcí jsme se v této práci zaměřili na zjištění role komárů v přenosu *T. theileri* a na zjištění prevalence u komárů na vybraných lokalitách v České republice, kde dosahovala až 6,4 %. Kromě komárů byla prevalence studována i u jeleních (4,0 %) a ovčích klošů (16,7 %).

Experimentální infekce měly za cíl ověřit potenciál komárů a flebotomů jako přenašečů *T. theileri*. Během experimentů bylo využito jednoho druhu flebotoma *Phlebotomus perniciosus* a tří druhů komárů *Culex pipiens molestus*, *Culex pipiens quinquefasciatus* a *Aedes vexans*, ale také izoláty *T. theileri* či *T. melophagium* s různým původem. V práci se během těchto experimentů projevila různorodost, jak mezi druhy komárů, tak mezi použitými izoláty. Nejlepších výsledků bylo dosaženo u kombinace *Aedes aegypti* s izoláty z komárů, kde prevalence dosahovala až 90,8 %. S úspěšnými infekcemi komárů byly následně prováděny experimenty s prediurezí, kdy byla ve vylučované tekutině detekována infekční stádia trypanosom.

Fylogenetická analýza získaných sekvencí *T. theileri* z terénních odchytů hmyzu či izolátů z krevních vzorků ukazuje variabilitu mezi námi získanými sekvencemi i v porovnání se sekvencemi z databáze. V naší analýze se ukazuje nová větev *T. theileri*, která nespadá ani do jedné z definovaných linií TthI a TthII. Zdá se, že fylogeneze trypanosom skupiny *T. theileri* je rozmanitější, než bylo zatím publikováno.

**Klíčová slova:** kloš, komár, flebotom, kopytník, prevalence, prediureze, vektor, *Trypanosoma theileri*, životní cykly, hostitelská specifita

## ABSTRACT

The *Trypanosoma theileri* group are blood parasites of ungulates. Confirmed vectors of these protists are horseflies or sheep keds for *T. melophagium*, but these trypanosomes were also detected in deer keds, mosquitoes and phlebotomus. We targeted on the investigation of possibility mosquitoes acting as vectors and additionally we targeted on the prevalence of *T. theileri* in mosquitoes at selected locations in the Czech Republic due to previous positive detection there. The measured prevalence has reached 6,4 % in mosquitoes, 4 % in deer keds and 16,7 % in sheep keds.

The aim of experimental infections was to discover a potential of mosquitoes and phlebotomus acting as vectors of the *T. theileri*. *Phlebotomus perniciosus* and three species of mosquitoes *Culex pipiens molestus*, *Culex pipiens quinquefasciatus* and *Aedes vexans* were used for those experiments. Furthermore, isolates of *T. theileri* and *T. melophagium* from different sources were used. The divergence among these isolates and among used species of insect was found. The best results were achieved with *Ae. aegypti* and isolates from mosquitoes, where prevalence had reached 90,8 %. The infected mosquitoes were used for prediuresis research which had shown infection forms of the trypanosomes in the urine liquid.

The phylogenetic analyse of *T. theileri* sequences from captured insects and blood samples presented diversity amongst obtained sequences but also there was diversity found with sequences from the public database. The analysis has shown a new branch *T. theileri*, which is not part of defined lines TthI and TthII. It seems likely that the phylogeny of *T. theileri* group is more divergent than it has been discovered to this day.

**Key words:** ked, mosquito, phlebotomus, ungulate, prevalence, prediuresis, vector, *Trypanosoma theileri*, life cycle, host specificity

## OBSAH

1. ÚVOD A CÍLE PRÁCE.....	1
2. LITERÁRÁNÍ PŘEHLED .....	2
2.1. Obecná charakteristika trypanosom skupiny <i>Trypanosoma theileri</i> .....	2
2.2. Morfologicky definované druhy skupiny <i>T. theileri</i> .....	2
2.3. Fylogeneze trypanosom skupiny <i>T. theileri</i> .....	4
2.4. Vývoj v hostiteli a patologie .....	6
2.5. Přehled známých a potencionálních vektorů.....	7
2.5.1. Ovádi (Tabanidae, Diptera).....	8
2.5.2. Kloši (Hippoboscidae, Diptera) .....	10
2.5.4. Flebotomové (Psychodidae, Diptera).....	11
2.5.5. Klíšťata (Ixodidae, Ixodida).....	12
2.5.6. Mouchy tse-tse (Glossinidae, Diptera).....	12
2.6. Detekce <i>T. theileri</i> v přenašeči a v hostiteli .....	13
2.7. Vliv teploty na vývoj patogenů v hostiteli .....	13
2.8. Diureze a prediureze u krevsajícího hmyzu .....	14
3. METODIKA .....	16
3.1. Získávání hmyzu a jeho determinace .....	16
3.1.1. Odchyt a determinace komárů .....	16
3.1.2. Sběr a determinace klošů .....	18
3.1.3. Odchyt a determinace ovádů.....	19
3.2. Pitva živého hmyzu a zpracování pozitivních nálezů .....	19
3.3. Krevní vzorky a jejich zpracování .....	20
3.4. Kultivace .....	21
3.4.1. Příprava pevné složky .....	21
3.4.2. Příprava tekuté složky.....	22
3.5. Sklizení, zamrazování a vymrazování kultur .....	23
3.6. Přechišťování kultur.....	24
3.7. Izolace DNA .....	25
3.8. Detekce trypanosomatid z izolované DNA.....	25
3.8.1. Klasická PCR.....	26
3.8.2. Nested PCR.....	27
3.8.3. Elektroforéza PCR produktu.....	28
3.8.4. Přechišťování PCR produktu ExoSAP .....	29
3.8.5. Sekvence a zpracování sekvencí .....	29
3.9. Fylogenetické zpracovávání sekvencí.....	30

3.10. Výpočet prevalence.....	30
3.11. Membránové sání.....	31
3.11.1. Chovy komárů.....	31
3.11.2. Chovy flebotomů .....	31
3.11.3. Průběh sání.....	32
3.11.4. Uchovávání komárů a flebotomů po sání .....	33
3.11.5. Pitva hmyzu po sání.....	34
3.12. Experimentální infekce myší.....	34
3.13. Xenodiagnostika.....	34
3.14. Prediureze u komárů .....	35
3.15. Giemsa-Romanowski barvení .....	35
3.16. Focení trypanosom ve světelném mikroskopu .....	35
3.17. Měření délky trypanosom z pořízených fotografií.....	35
3.18. Skenovací elektronový mikroskop.....	36
4. VÝSLEDKY .....	37
4.1. Detekce <i>T. theileri</i> u komárů.....	37
4.2. Detekce <i>T. theileri</i> u ovádů .....	39
4.3. Detekce <i>T. theileri</i> u klošů rodu <i>Lipoptena</i> .....	40
4.4. Detekce <i>T. melophagium</i> u klošů <i>Melophagus ovinus</i> .....	41
4.5. Infekční sání.....	41
4.5.1. Výsledky sání s <i>Culex pipiens quinquefasciatus</i> a <i>Cx. p. molestus</i> s uchováváním v různých teplotách.....	41
4.5.2. Výsledky sání s <i>Aedes aegypti</i> s uchováváním při teplotě 21 °C .....	43
4.5.3. Výsledky sání s <i>Phlebotomus perniciosus</i> .....	45
4.6. Infekce laboratorních myší.....	47
4.7. Morfologie trypanosom u komára a ováda .....	47
4.8. Prediureze u infikovaných komárů .....	48
4.9. Vyšetřování krevních vzorků .....	49
4.10. Fylogenetická analýza.....	49
5. DISKUSE.....	52
5.1. Detekce <i>T. theileri</i> v odchyceném hmyzu.....	52
5.1.1. Komáři .....	52
5.1.2. Kloši.....	53
5.1.3. Ovádi.....	54
5.2. Komáři a flebotomové jako potencionální přenašeči <i>T. theileri</i> .....	55
5.3. Infekce laboratorních komárů a myší.....	57

5.4.	Vyšetřování krve jelenovité zvěře.....	57
5.5.	Fylogenetická analýza.....	57
6.	SHRNUTÍ .....	60
7.	ZÁVĚR .....	61
8.	LITERATURA.....	62
8.1.	Sekundární citace .....	74
8.2.	Odkazy internetových stránek.....	74



## Seznam zkratek a definice pojmů

- **Pojmy**

- hostitel – v této práci zahrnuje vždy savčího hostitele
- genotyp – geneticky odlišné varianty spadající do skupiny *T. theileri*
- *T. theileri*-like - *T. theileri* parazitující u jiných než dobytčích hostitelů
- amastigote-like – buňky podobné amastigotům
- metacykličtí trypomastigoti/metacykly – infekční stadia pro hostitele

- **Zkratky**

- BLAST – Basic Local Alignment Search Tool
- CATL – cathepsin L
- CDC – Centers for Disease Control
- gGAPDH – glykosomální glyceraldehyd fosfát dehydrogenáza
- ITS – internal transcribed spacer
- MIR – Minimum Infection Rate
- PCR – polymerázová řetězová reakce
- RAPD – random amplification of polymorphic DNA
- SL – spliced leader
- SSU rRNA – malá ribosomální podjednotka

# 1. ÚVOD A CÍLE PRÁCE

*Trypanosoma theileri* (Laveran, 1902) je kosmopolitním nepatogenním parazitem, vyskytujícím se u různých kopytníků, jako je dobytek, jelenovitá zvěř, ovce, kozy, buvoli či antilopy (Hoare 1972b; Rodrigues et al. 2003). Ve většině případů nepůsobí žádné onemocnění, ale v ojedinělých případech může být příčinou závažných klinických příznaků až smrti hostitele. V některých případech byla tato trypanosoma detekována souběžně s další infekcí, ale některá onemocnění byla způsobena pouze *T. theileri* (Wells 1976; Doherty et al. 1993; Seifi 1995; Greco et al. 2000; Braun et al. 2002; Sood et al. 2011). V porovnání se známými trypanosomami (*T. b. brucei*, *T. evansi*, *T. equiperdum*) způsobujícími nemoc nagana, surra či dourina není natolik veterinárně a ekonomicky významná, proto není v popředí zájmu výzkumu. Přestože v posledních letech se objevily fylogenetické studie odhalující velkou genetickou variabilitu, stále není zcela objasněn vývoj v hostiteli a neexistují porovnání mezi současně odhalenými genotypy a dříve morfologicky definovanými druhy. Další prostor pro výzkum je na úrovni přenašečů, kde mezi potvrzené vektory spadají ovádi (*T. theileri*) a ovčí (*T. melophagium*) či kozí kloši (*T. theodori*). Stále ale existují neprobádané potencionální skupiny, ve kterých byla *T. theileri* detekována, například komáři, jelení kloši či flebotomové (Böse a Petersen 1991; Schönenberger et al. 2016; Calzolari et al. 2018). Výzkum je navíc ztížen obtížnou detekcí trypanosom v hostitelích a nemožností využití laboratorních zvířat kvůli nízké parazitěmii a hostitelské specifitě.

Tato práce byla započata kvůli detekcím *T. theileri* u hmyzu při studiu ptačích trypanosom v rámci našeho týmu. *T. theileri* byla hojně detekována pomocí PCR u deseti druhů komárů a několika blíže neurčených muchniček, a to častěji než ptačí trypanosomy (Svobodová et al. nepublikováno).

Cíle diplomové práce:

- Zjistit prevalenci trypanosom skupiny *T. theileri* v komárech na vybraných lokalitách.
- Zjistit prevalenci *T. theileri* u jeleních klošů a *T. melophagium* u ovčích klošů.
- Prozkoumat experimentálně potenciál přenosu *T. theileri* u různých vektorů.
- Provést fylogenetickou analýzu získaných sekvencí *T. theileri* z vektorů a savců.

## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1. Obecná charakteristika trypanosom skupiny *Trypanosoma theileri*

*Trypanosoma theileri* spadá do podrodu *Megatrypanum*, rodu *Trypanosoma*, řádu Kinetoplastea, kmene Euglenozoa, říše Excavata (Adl et al. 2005). Trypanosomy tohoto podrodu patří do sterkorální skupiny a jsou přenášeny kontaminativně pozřením infikovaného vektora nebo trusu. V závislosti na stádiu mohou tyto trypanosomy dosahovat velikosti od 5  $\mu\text{m}$  do 130  $\mu\text{m}$ . Tito bičíkovci mají velký kinetoplast lokalizovaný v blízkosti jádra dále od konce buňky. Nejznámější trypanosomy podrodu *Megatrypanum* jsou *T. theileri* a *T. melophagium*, parazitují u kopytníků, avšak byly identifikovány taktéž u primátů, netopýrů, hlodavců, hmyzožravců a šelem (Hoare 1972a).

*Trypanosoma theileri* je cizopasníkem dobytka, ale existují různé genotypy parazitující u různých druhů kopytníků. Některé tyto trypanosomy byly v minulosti definovány jako samostatné druhy na základě infekčních pokusů a odlišné morfologie, například *T. melophagium* a *T. cervi* (Hoare 1964, Hoare 1972a; Wells 1976; Böse et al. 1987; Kingston a Morton 1975). S nástupem molekulárních metod bylo zjištěno, že diverzita v rámci těchto trypanosom u kopytníků je daleko větší a existují i různé genotypy parazitující u stejných druhů zvířat. Genotypy parazitující u jiných kopytníků než dobytka se označují jako *T. theileri*-like (Böse et al. 1993; Rodrigues et al. 2006; Fisher et al. 2013). V následujících kapitolách budou představeny jak morfologicky definované druhy, tak fylogenetické studie této skupiny. Následovat budou kapitoly o patologii a vektorech těchto trypanosom.

### 2.2. Morfologicky definované druhy skupiny *T. theileri*

*Trypanosoma theileri* (Laveran, 1902) je celosvětově rozšířeným parazitem. Tato trypanosoma byla popsána již na začátku minulého století, během něhož byla identifikována a popsána pod různými názvy (Hoare 1972f). Potvrzenými přenašeči jsou ovádi, Tabanidae (Böse et al. 1987; Rodrigues et al. 2006). Tato trypanosoma byla identifikována u různých druhů kopytníků, ale především je považována za parazita dobytka (*Bos taurus*) a nálezy u ostatních zvířat jsou označovány jako *T. theileri*-like (Rodrigues et al. 2003).

*Trypanosoma melophagium* (Flu, 1908) je nepatogenním parazitem ovčí domácí (Ovis aries), ale předpokládá se i výskyt u ovčí ve volné přírodě. Vektorem těchto bičíkovců jsou kloši ovčí (*Melophagus ovinus*). Přestože je tato trypanosoma hostitelsky i vektorově specifická, analýzou SSU rRNA a SL bylo prokázáno, že se jedná o vnitřní genotyp skupiny *T. theileri* (Hoare 1972e; Gibson et al. 2010).

*Trypanosoma theodori* (Hoare, 1931) je trypanosoma vyskytující se u koz, jejímž vektorem jsou kloši *Lipoptena capreoli*. V krvi se vyskytuje v nízkém množství a hostiteli nepůsobí žádné onemocnění. Stejně jako *T. melophagium* není v popředí zájmu výzkumu a v současných studiích spíše není zmiňována. Výskyt je na území Blízkého Východu a jihovýchodní Evropy (Bequaert 1942; cit. podle Hoare 1972f; Hoare 1972f).

Přestože *T. mazamarum* (Mazza, Romaña a Fiora, 1932) byla popsána začátkem 20. století, neexistuje o ní doposud mnoho informací. Je parazitem jelenovitých kopytníků mazama a popsána byla v Jižní Americe (Hoare 1972d). *Trypanosoma mazamarum* byla popsána u *Mazama simplicornus*, *M. rufa toba* a *M. nemorivaga* (Deane 1961; cit podle Hatama et al. 2007).

Ve Spojených státech byly savčí trypanosomy postupně objevovány od konce šedesátých let 20. století u různých druhů jelenovité zvěře. Trypanosomy podrodu *Megatrypanum* byly nalezeny v jelenci běloocasém (*Odocoileus virginianus*), jelenci ušatém (*O. hemionus*), jelenu wapiti (*Cervus canadensis*), bizonu americkém (*Bison bison*) a vidlorohu americkém (*Antilocapra americana*). Tyto trypanosomy byly morfologicky odlišné od již popsaných *T. theileri* a *T. mazamarum* (Kistner a Hanson 1969; Clark 1972; Davies a Clark 1974; Stuht 1975; Kingston et al. 1981). Kingston a Morton (1975) definovali nový druh *T. cervi* pocházející z krevních vzorků jelena wapiti (*C. canadensis*). Autoři morfologicky analyzovali bičíkovce a porovnali je se známými druhy trypanosom podrodu *Megatrypanum* u kopytníků. Nejen že zde byly morfologické odlišnosti, ale při experimentálních nákazách dobytka (*Bos taurus*) se ukázalo, že bičíkovci nejsou schopni zvířata infikovat, zatímco kontrolní zvířata inokulovaná *T. theileri* byla pozitivní. *Trypanosoma cervi* byla na území Spojených států taktéž identifikována v jelenci ušatém, jelenci běloocasém a losu evropském (*Alces alces*) (Kingston et al. 1975; Kingston et al. 1981; Davidson et al. 1983; Kingston et al. 1985).

Následující nálezy trypanosom pocházely z Evropy, kdy byly zařazeny pouze do podrodu *Megatrypanum*, popřípadě se uvažovalo, že se jedná o *T. cervi*. Trypanosomy byly nalezeny u kopytníků daňka evropského (*Dama dama*), srnce obecného (*Capreolus*

*capreolus*), jelena evropského (*Cervus elaphus*) a losa evropského (Friedhoff et al. 1984; Hoffmann et al. 1984; Kingston a Bobek 1985; Kingston et al. 1985).

Na základě morfologie odlišné od *T. cervi* a *T. theileri* byl v roce 1992 v Polsku ze srnce obecného izolován a popsán nový druh *Trypanosoma stefanskii* (Kingston et al. 1992). O nálezu této trypanosomy se zmiňuje pouze jedna studie, a jelikož byla tato trypanosoma definována pouze morfologicky a v dnešní době se používají k druhové identifikaci molekulární metody, neexistuje žádné srovnání *T. stefanskii* s již popsanými druhy či odlišnými genotypy těchto trypanosom, které se v následujících letech objevují v různých studiích nejen v Evropě (Böse et al. 1993; Hatama et al. 2007; Neumuller et al. 2012).

Dalšími morfologicky definovanými odlišnými druhy u kopytníků byly *Trypanosoma ingens* (Bruce et al., 1909), *T. tragelaphi* (Kingham a York, 1913) a *T. cephalophi* (Bruce et al., 1915) v Africe a v Asii. *Trypanosoma tragelaphi* a *T. cephalophi* byly popsány u antilop, *T. ingens* u kančilovitých, antilop a dobytka (Hoare 1972b; Bigalke et al. 1972). Později byly spíše považovány za synonymní druhy *T. theileri*, ale s příchodem molekulárních metod se ukazuje, že existují odlišné genotypy parazitující u antilop (Fisher et al. 2013).

### 2.3. Fylogeneze trypanosom skupiny *T. theileri*

Podle fylogenetických analýz je skupině *T. theileri* nejpříbuznější *T. cyclops* (Weinman, 1972), jež je parazitem u makaků (*Macaca* sp.) (Rodrigues et al. 2006; Hamilton et al. 2007). Již u prvních studií využívající molekulární metody RAPD a sekvenaci SSU rRNA, ITS1 nebo SL bylo zjištěno, že *T. theileri* se dělí do dvou linií TthI a TthII (Rodrigues et al. 2003, Rodrigues et al. 2006; Rodrigues et al. 2010a). V průběhu následujících let bylo v rámci těchto dvou linií odlišeno několik genotypů. Některé izoláty odpovídají hostitelské specifitě a tvoří pouze jeden genotyp, ale v některých případech trypanosomy parazitující u jednoho druhu hostitele tvoří více genotypů (Rodrigues et al. 2006; Garcia et al. 2011b). Nejnovější studie v závislosti na analyzovaných genech odlišují až 13 genotypů v rámci linie TthI (IA – IL) a až šest genotypů v linii TthII (IIA – IID) (Yokoyama et al. 2015; Pacheco et al. 2018).

Pro zkoumání diverzity v rámci skupiny *T. theileri* se osvědčily zejména geny ITS1, ITS2, SL a CATL, které jsou variabilnější, zatímco geny SSU rRNA a gGAPDH jsou konzervovanější a nedokáží úplně ujasnit vnitřní diverzitu genotypů v rámci linií

(Rodrigues et al. 2010a; Rodrigues et al. 2010b; Garcia et al. 2011a; Garcia et al. 2011b; Fisher et al. 2013).

Na základě fylogenetických studií se ukázalo, že *T. theileri* pocházející z dobytka tvoří nezávisle na geografickém výskytu více odlišných genotypů spadající do linií TthI i TthII (Rodrigues et al. 2006; Garcia et al. 2011a; Garcia et al. 2011b; Jaimes-Dueñez et al. 2018; Suganuma et al. 2019).

Trypanosomy z jelenovitých vytvářejí taktéž více genotypů, které se nacházejí v obou dvou liniích (Fisher et al. 2013). Přestože v minulosti bylo morfologicky definováno několik druhů trypanosom pocházejících z jelenovitých, neexistuje studie, která by je porovnávala s molekulárně definovanými genotypy. Nejobsáhlejší studie zkoumající fylogenezi trypanosom jelenovité zvěře pochází z USA, kdy byla analyzována a porovnána *T. cervi* z jelence běloocasého a jelena wapiti společně s izoláty z daňka evropského (Německo) a z jelena sika (Japonsko). V rámci této studie byly definovány odlišné genotypy pro všechny tyto izoláty (Rodrigues et al. 2010a; Garcia et al. 2011b; Fisher et al. 2013). Fisher et al. (2013) taktéž ukazují, že existují odlišné genotypy u stejného druhu zvířat, a to jak u jelence běloocasého, tak i jelena wapiti. V roce 2020 byla na základě genetické odlišnosti nově definována *Trypanosoma trinaperronei* (Teixeira et al., 2020), která spadá do skupiny *T. theileri*, linie TthII. Tato trypanosoma byla nalezena v jelenci běloocasém a *Lipoptena mazamae* (Garcia et al. 2020).

Rozdílnou situaci ukazují izoláty *T. theileri*-like z vodních buvolů (*Bubalus bubalis*), které tvoří jednotný genotyp (TthI D) (Rodrigues et al. 2003, Rodrigues et al. 2006). Samostatný genotyp prezentuje taktéž *T. melophagium*. V publikovaných fylogenetických stromech vždy spadá do linie TthII genotypu IID. Všechny analyzované sekvence doposud pocházejí z ovčích klošů ze dvou lokalit z Chorvatska a Skotska (Gibson et al. 2010; Garcia et al. 2011b; Martinković et al. 2012; Fisher et al. 2013). Nicméně v roce 2020 byly do databáze GenBank přidány nové sekvence z ovčích klošů z Mexika, které nebyly zatím publikované, ale v této práci byly použity do fylogenetického stromu.

Některé studie zahrnují do fylogenetických analýz i izoláty pocházející z afrických antilop chocholátky modré (*Philantomba monticola*), sitatungy (*Tragelaphus spekii*) a vodušky puku (*Kobus vardonii*). Všechny tyto izoláty spadají do linie TthII (Garcia et al. 2011b; Fisher et al. 2013; Suganuma et al. 2019). Garcia et al. (2011b) ve fylogenetické analýze na základě více genů ukazuje jak genetickou variabilitu izolátů ze

sitatumy i izolátů z chocholaty modré navzájem, tak rozdílnost od ostatních studovaných izolátů z dobytka, ovcí či jelenovité zvěře.

U *Trypanosoma theodori*, *T. stefanski* a *T. mazamarum* neexistují dostupné sekvence. Gibson et al. (2010) předpokládají, že by *T. theodori* mohla spadat do skupiny *T. theileri* a být hostitelsky specifickou jako *T. melophagium*, se kterým má obdobný vývoj v přenašeči.

## 2.4. Vývoj v hostiteli a patologie

Nákaza hostitele probíhá kontaminativně pozřením infekčního vektora či trusu, popřípadě vetřením trusu do oděrek či sliznice (Böse 1987). Popis vývoje *T. theileri* v hostiteli je ztížen nízkou parazitémií. U dobytka, ovcí a jelenovité zvěře byli pozorováni v krvi trypomastigoti a epimastigoti. Množícím se stádiem jsou epimastigoti, kteří se v krvi nebo ve vnitřních orgánech binárně dělí (Hoare 1972f; Hoare 1972e; Friedhoff et al. 1984; Kingston et al. 1985; Talat et al. 2005). V závislosti na infekční dávce byla prepatentní perioda při experimentálních nákazách dobytka od čtyř do 20 dnů. Vyšší parazitémie může *T. theileri* dosahovat na začátku infekce a následně po několika týdnech počet parazitů v krvi klesá. Chronická fáze infekce je charakterizována výskytem trypomastigotů v krvi, kteří slouží k infekci vektora (Hoare 1972f, Hoare 1972e). Pomocí kultivace, PCR či přímé mikroskopie byly trypanosomy detekovány i v jiných tkáních než v krvi, a to ve slezině, mozku, kostní dřeni, varlatech, ledvinách, mizních uzlinách, mozkomíšním moku i peritoneální tekutině (Doherty et al. 1993; Braun et al. 2002; Hatama et al. 2007; Sood et al. 2011; Amato et al. 2019). Lee et al. (2013) ukázali, že *in vitro* je *T. theileri* schopna invadovat savčí buňky a intracelulárně se množit ve formě amastigotů.

Infekce *T. theileri* může probíhat bezpříznakově, symptomaticky či končit smrtelně. Onemocnění bývá často spojeno s další infekcí, imunosupresí nebo březostí, ale existují i záznamy, kdy nebyla další infekce detekována (Wells 1976; Doherty et al. 1993; Seifi 1995; Greco et al. 2000; Braun et al. 2002; Sood et al. 2011).

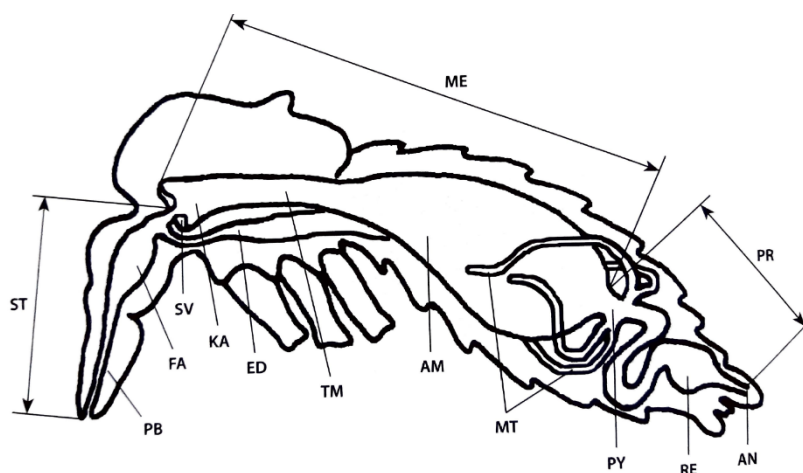
Mezi klinickými příznaky onemocnění je nejčastěji pozorována anémie, ztráty na hmotnosti až anorexie, horečky, hemorrhagie střeva s krvavými průjmy, pokles produkce mléka (Ward et al. 1984; Doherty et al. 1993; Seifi 1995; Lanevski-Pietersma et al. 2004; Villa et al. 2008; Sood et al. 2011; Vairamuthu et al. 2011; Neumuller et al. 2012; Jaimes-Dueñez et al. 2018). U některých případů byla zaznamenána meningoencefalitida, leukocytóza, tachykardie a tachypnoe (Cross et al. 1971; Seifi 1995; Braun et al. 2002).

Některé studie zkoušely infekce laboratorních zvířat, ale infekční pokusy nebyly nikdy úspěšné. Trypanosomy z kultur či z vypitvaného hmyzu byly inokulovány do myší, potkanů či morčat. Inokulace probíhala perorálně, intravenózně nebo intraperitoneálně, ale parazitémie nebyla nikdy detekována (Hoare 1972e; Dirie et al. 1990). Při studiu ovádů jako vektorů byli úspěšně infikováni pozitivními střevy jak telata (*Bos taurus*), tak jeden až dva roky staří jedinci daňka evropského (Böse et al. 1987).

## 2.5. Přehled známých a potenciálních vektorů

Přenos *T. theileri* probíhá kontaminativně. K nákaze dochází pozřením infekčního vektora při groomingu či allogroomingu, kdy se zvířata zbavují ektoparazitů sama či navzájem, anebo může přenos probíhat vetřením trusu přenašeče obsahujícím metacyklické trypanosomy do sliznic či oděrek (Hoare 1972c; Hoare 1972e; Böse et al. 1987; Böhm et al. 2007). Kromě nákazy skrze vektory byl popsán transplacentální přenos na mláďata u dobytka a jelenovité zvěře (Kingston et al. 1981; Lanevski-Pietersma et al. 2004).

V následujících podkapitolách budou představeni prokázání i potenciální přenašeči trypanosom skupiny *T. theileri*. Jelikož jsou při popisu probíhající infekce specifikovány části střeva, kde dochází k vývoji trypanosom, lze pro snadnější orientaci využít obrázek 2.1.



**Obrázek 2.1:** Schéma trávicí trubice hmyzu na příkladu flebotoma.

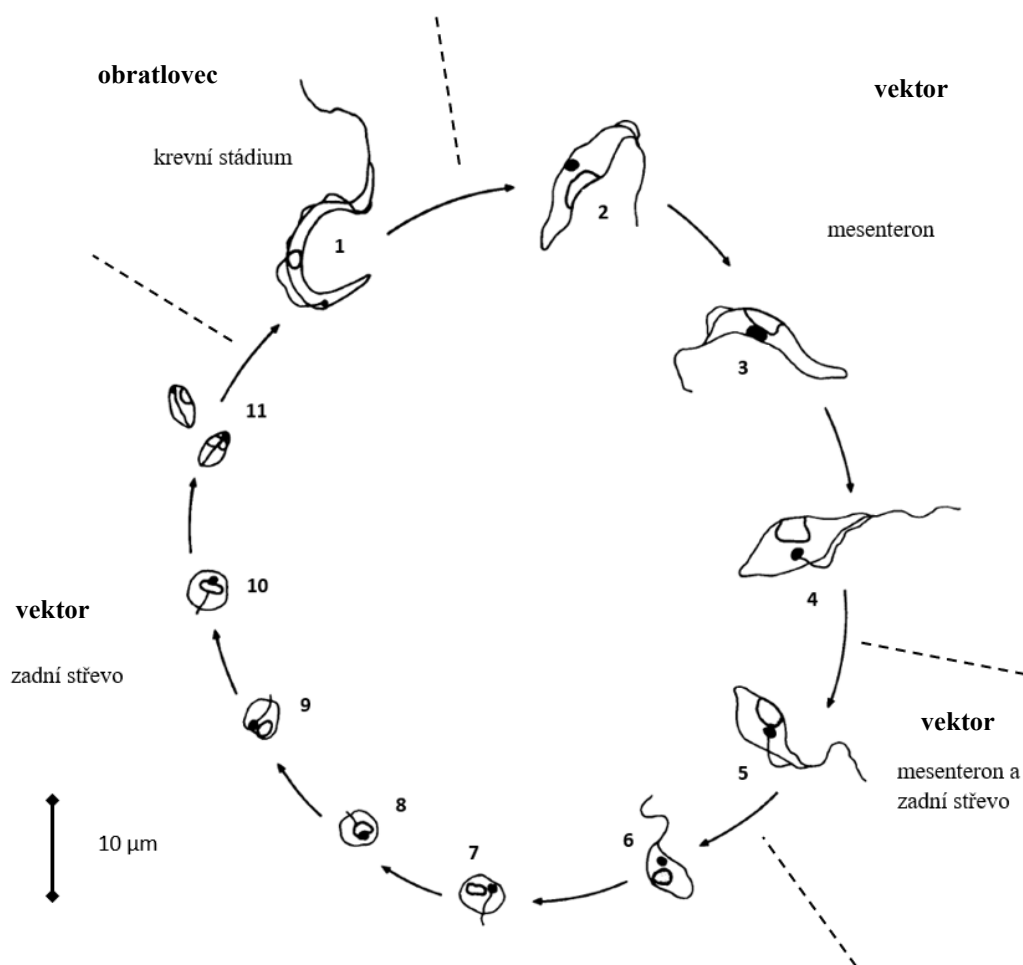
Tři hlavní části: **ST:** stomodeum, **ME:** mesenteron, **PR:** proktodeum. Podrobnější členění: **PB:** proboscis, **FA:** farynx, **SV:** stomodeální valva, **KA:** kardie, **ED:** esofaryngeální divertikulum (vole), **TM:** thorakální mesenteron, **AM:** abdominální mesenteron, **MT:** malpighické trubice, **PY:** pylorus, **RE:** rektum, **AN:** anální otvor. Převzato a upraveno z Volf et al. (2007).



### 2.5.1. Ovádi (Tabanidae, Diptera)

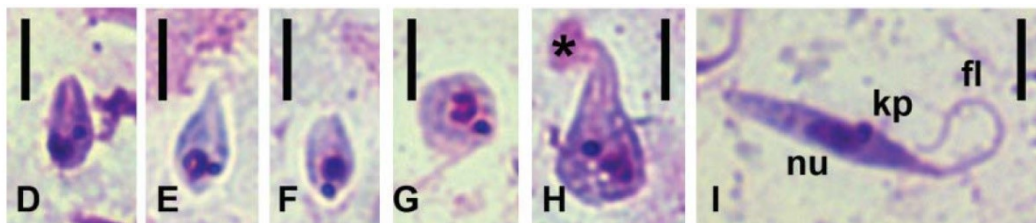
Úspěšné infekční pokusy s ovády jako vektory *T. theileri* byly prováděny již na začátku 20. století (Hoare 1972f). Böse et al. (1987) popsali úspěšnou infekci dobytka i daňků z pozitivních střev trypanosomami z podrodu *Megatrypanum*. Navíc pomocí ovádů odchycených z různých lokalit buď s výskytem dobytka nebo jelenovité zvěře dokázali, přítomnost různých genotypů ve stejných vektorech.

Böse a Heister (1993) popisují vývoj *T. theileri* v ovádech po nasátí na pozitivním zvířeti (obrázek 2.2). Již po jednom dni od nasátí se ve střevě nevyskytují trypomastigoti, krevní formy *T. theileri*. V mesenteronu se 29  $\mu\text{m}$  velcí epimastigoti dělí na menší buňky o velikosti 26  $\mu\text{m}$ . Poté se trypanosomy postupně přesouvají do zadního střeva, kde se vyvíjí metacykličtí trypomastigoti o velikosti 5  $\mu\text{m}$ , kteří se mohou dále dělit a jsou infekční pro hostitele. Recentní studie (Ganyukova et al. 2018) nachází podobné morfologie a rozměry bičíkovců. V pozitivních střevech ovádů nachází méně pohyblivé amastigote-like buňky s různým postavením kinetoplastu, kulatější sféromastigoty a epimastigoty s volným bičíkem, ale i s přeměněným hemidesmosomem určeným k uchycení ke střevu (obrázek 2.3). Paraziti se během vývoje vyskytují v mesenteronu a v proktodeu, zatímco ve stomodeu nebyly zaznamenány žádné *T. theileri*-like trypanosomy (Krinsky a Pechuman 1975; Böse a Heister 1993). Podobný vývoj trypanosom byl popsán u *T. melophagium* ve střevě ovčích klošů (Hoare 1972e; Molyneux 1975; Molyneux et al. 1978).



**Obrázek 2.2:** Vývoj *Trypanosoma theileri* ve střevě ováda.

**1:** Trypomastigoti, krevní formy v obratlovci, **2 – 11:** vývojová stádia ve střevě vektora, **2 – 3:** vývoj epimastigotů první tři dny po infekci v mesenteronu, **5:** epimastigoti čtvrtý den po infekci ve středním a zadním střevu, **6:** epimastigoti v zadním střevě, **7 – 11:** metacyklickí trypomastigoti v zadním střevě, **11:** dělící se stádia metacyklů. Převzato a upraveno z Böse a Heister (1993).



**Obrázek 2.3:** *Trypanosoma theileri*-like ze střeva pozitivních ovádů.

Barveno Geimsa-Romanowski. Měřítko je 5 µm. **D – F:** amastigote-like/metacyklický trypomastigoti, **G:** sféromastigot, **H:** epimastigot s hemidesmosomem (označen \*), **I:** epimastigot, nu – nukleus, kp – kinetoplastu, fl – bičík. Převzato a upraveno z Ganyukova et al. (2018)

Molekulární analýzy potvrzují, že ovádi přenášejí různé genotypy, a byly zaznamenány i smíšené infekce (Ganyukova et al. 2018; Werszko et al. 2019). Přesto však v hostitelích nebyly smíšené infekce zaznamenány (Garcia et al. 2011b), což může být způsobeno nízkou parazitémií *T. theileri* v hostitelích a jejich obtížnou detekcí.

Výskyt trypanosom *T. theileri* byl potvrzen v rodech *Ancala* (*A. fasciata*), *Haematopota* (*Hae. albihirta*, *Hae. ciliatipes*, *Hae. italica*, *Hae. pluvialis*, *Hae. subcylindrica* a další), *Hybomitra* (*Hy. arpadi*, *Hy. bimaculata*, *Hy. micans*, *Hy. muehlfeldi*, *Hy. tarandina*), *Chrysops* (*C. divaricatus*, *C. longicornis*, *C. silaceus*) a *Tabanus* (*T. bromius*, *T. distinguendus*, *T. fraternus*, *T. glaucopsis*, *T. ianthinus* a další) (Böse et al. 1987; Dirie et al. 1990; Böse et al. 1993; Votýpka et al. 2015; Ganyukova et al. 2018; Votýpka et al. 2019; Werszko et al. 2019; Mulandane et al. 2020).

Prevalence *T. theileri*-like v ovádech byla celkově 12,9 % (12/70) v Anglii (Dirie et al. 1990), v severozápadním Rusku byla prevalence *T. theileri*-like 31 % (9/29) (Ganyukova et al. 2018) a podobná prevalence 33,7 % (32/95) byla detekována u ovádů odchycených v Polsku (Werszko et al. 2019).

### 2.5.2. Kloši (Hippoboscidae, Diptera)

Role klošů *Melophagus ovinus* jako přenašečů ovčích trypanosom byla jasná již na začátku 20. století (Hoare 1972e). Tito kloši žijí v srsti ovcí, kde prodělávají celý životní cyklus. Jelikož nemají křídla, jsou kloši mezi ovci přenášeni blízkým kontaktem zvířat ve stádě (Small 2005). K nákaze klošů postačuje malá infekční dávka trypanosom z krve hostitele (Hoare 1972e). Vývoj trypanosom probíhá v mesenteronu a v zadní části střeva. Po nasátí se v kloši trypomastigoti vyvíjejí v epimastigoty, kteří se přichycují ke stěně střeva pomocí hemidesmosomu. V mesenteronu a v zadní části střeva dochází k množení epimastigotů hruškového tvaru. Nakonec se v zadním střevě tvoří metacykličtí trypomastigoti velikosti 5 – 8 µm. Metacykličtí trypomastigoti mají velký kinetoplast, který je situovaný na samém okraji buňky. Bičík tvoří nenápadnou undulující membránu a nemusí končit volným bičíkem. Kromě epimastigotů a metacyklických trypomastigotů, byly v zadním střevu a v rektu pozorovány amastigotní formy (Hoare 1972e; Molyneux 1975; Molyneux et al. 1978; Martinković et al. 2012). Prevalence u vyšetřovaných klošů byla 82,4 % ve Skotsku a 85,9 % v Chorvatsku (Gibson et al. 2010; Martinković et al. 2012).

*Lipoptena capreoli* je vektorem trypanosom *T. theodori* vyskytující se u koz. Na rozdíl od ovčích klošů část vývoje kloše probíhá mimo hostitele. Kukly spadávají do půdy

a po prodělání vývoje se líhne okřídlený dospělec, který vyhledává hostitele. Po jeho nalezení křídla odlamuje a již svého hostitele nemění. Vývoj trypanosom ve střevě je obdobný jako u klošů ovčích (Hoare 1972g).

Myšlenka jeleních klošů jako potencionálních vektorů trypanosom u spárkaté zvěře se zrodila již v roce 1991, kdy byly trypanosomy nalezeny u *Lipoptena cervi*, ale od té doby nebyly provedeny žádné další studie s tímto druhem (Böse a Petersen 1991). Jelení kloši mají podobný vývojový cyklus jako *L. capreoli*, kdy kukly spadávají do půdy a po nalezení hostitele okřídlenými dospělci dochází k odlamování křídel (Chvála et al. 1980a). Při vyšetřování klošů *L. cervi* bylo devět pozitivních nálezů z 37 vypitvaných pocházejících z 6 zvířat, tj. 24,3 %. Ve střevě byli pozorováni pouze podlouhlí a hruškovití epimastigoti (Böse a Petersen 1991). Další zmínka o kloších v souvislosti s trypanosomami této skupiny pochází recentně z roku 2020, kdy byla detekována pomocí PCR nově popsaná *T. trinaperronei*. Kloši *Lipoptena mazamae* byli sesbíráni z 15 jelenců běloocasých a 38 % (11/29) klošů bylo pozitivních (Garcia et al. 2020).

#### **2.5.3. Komáři (Culicidae, Diptera)**

V roce 2018 byl popsán výskyt *T. theileri*-like u komárů ve východním Rakousku. Ve studii bylo celkem odchyceno 30 000 komárů 19 druhů. Trypanosomy byly detekovány v poolech pomocí PCR a pozitivní vzorky byly následně sekvenovány. Zatímco v ornithofilních komárech rodu *Culex* byly nacházeny především ptačí trypanosomy (*T. culicavium*, *T. avium*), *T. theileri* byla detekována v *Aedes cinereus/geminus*, *Ae. vexans*, *Ae. sticticus*, *Ae. geniculatus*, *Anopheles plumbeus*, *Mansonia richiardii*, *Culex pipiens* (Schoener et al. 2018). Hodnota MIR *T. theileri* v odchycených komárech se pohybovala od 3,9 % (*Ae. geniculatus*) do 0,01 % (*Cx. pipiens*), celkově 0,4 % (Schoener et al. 2018).

#### **2.5.4. Flebotomové (Psychodidae, Diptera)**

*Trypanosoma theileri*-like byla detekována taktéž ve *Phlebotomus perfiliewi* v Itálii. Vývojová stadia trypanosom byla detekována v zadním střevě bez přítomnosti krve v jednom flebotomovi z celkového počtu 2 646 vyšetřovaných samic. Při fylogenetické analýze SSU rRNA a ITS1 byla prokázána příbuznost s jeleními izoláty z linie TthII. Přestože byla nalezena infekční stadia ve střevě, samotní autoři diskutují, že by se mohlo jednat o nespecifický vývoj parazita, a proto by bylo vhodné učinit další studie pro objasnění role flebotomů v přenosu těchto trypanosom (Calzolari et al. 2018).

### 2.5.5. Klíšťata (Ixodidae, Ixodida)

Rozdílné názory panují na roli roztočů jako možných vektorů *T. theileri*. Tato trypanosoma byla nalezena v hemolymfě u různých druhů klíšťat *Hyalomma anatolicum anatolicum*, *Amblyomma americanum*, *Boophilus microplus* a při experimentech byla pozorována taktéž v jednom jedinci *Ornithodoros moubata* (Krinsky a Burgdorfer 1976; Shastri a Deshpande 1981; Latif et al. 2004; Martins et al. 2008).

Hoare (1972a) zpochybňoval roli klíšťat jako vektorů trypanosom a zastával názor, že hemolymfa slouží prvokům jako médium a zdroj živin pro jejich množení v klíšťatech. V následujícím desetiletí byly publikovány studie, které popisují přenosy trypanosom na klíšťata a taktéž přenosy z roztočů na telata (Shastri a Deshpande 1981; Morzaria et al. 1986). Shastri a Deshpande (1981) popsali, jak přenos trypanosom na klíšťata *H. a. anatolicum*, tak experimentální nákazy telat, kdy byla zvířata infikovaná suspenzí trypanosom pocházejících z těchto pozitivních roztočů. Ne zcela jasný výsledek přináší Morzaria et al. (1986), při využití *H. a. anatolicum*. Zatímco předchozí studie počítají s kontaminativním přenosem a telata byla infikována inokulativně suspenzí trypanosom, zde byli pozitivní roztoči ponecháni se nasát na teleti. Při vyšetřování zvířete byly pouze v jednom případě nalezeny trypanosomy v uzlině poblíž sajících klíšťat. Ale sami autoři popisují, že nemohou vyloučit infekci telete již před pokusem.

Přítomnost trypanosom v klíšťatech popsali taktéž Latif et al. (2004), kdy ponechali *H. a. anatolicum* nasát na nakažených telatech s *T. theileri* a *T. vivax*. Na roztěrech hemolymfy byly pozorovány epimastigotní, promastigotní, trypomastigotní a amastigotní formy, přičemž dělicí se stádia byla epimastigotní a amastigotní. Morzaria et al. (1986) pozorovali na roztěrech hemolymfy kromě epimastigotů a trypomastigotů i sféromastigoty.

### 2.5.6. Mouchy tse-tse (Glossinidae, Diptera)

Neprobádanou skupinou v rámci přenosu *T. theileri* jsou mouchy tse-tse. Votýpka et al. (2015) detekovali pozitivní nález v *Glossina fuscipes fuscipes*. V jiné studii však při vyšetřování glossin nebyla *T. theileri* detekována, pouze byly nacházeny *T. vivax*, *T. congolense*, *T. brucei* spp. a *T. grayi* (Ngomtcho et al. 2017).

## 2.6. Detekce *T. theileri* v přenašeči a v hostiteli

Detekce *T. theileri*-like v hostiteli je obtížná, jelikož se v krvi vyskytují ve velmi malém množství a existuje riziko získávání zavádějících negativních výsledků (Hoare 1972f; Neumuller et al. 2012). Pro detekci jsou používány různé techniky, které mají odlišnou citlivost. Nejméně účinnou technikou je detekce pomocí krevních roztěrů nebo použití techniky mikrohematokritu. Naopak mezi úspěšnější metody patří detekce pomocí kultivace krevních vzorků (Stuht 1975; Kingston a Bobek 1985; Dirie et al. 1990; Greco et al. 2000; Rodrigues et al. 2003; Nalbantoğlu a Karaer 2008; Rodrigues et al. 2010b; Garcia et al. 2011a; Garcia et al. 2020). Přestože je kultivace velmi efektivní technikou při detekci trypanosom, je třeba při odběrech dbát na sterilní odběr a předejít kontaminacím (Hoffmann et al. 1984; Neumuller et al. 2012). Další metodou účinnější než krevní roztěry je použití PCR detekce v krevním vzorku (Rodrigues et al. 2010b; Garcia et al. 2011a; Garcia et al. 2020).

Při detekci ovčích trypanosom lze využít nepřímou detekci trypanosom v ovčích kloších, kteří mohou naznačit pozitivní výsledky, přestože vyšetřování hostitele je negativní (Martinković et al. 2012). Další nepřímou metodou může být detekce protilátek. Neumuller et al. (2012) při vyšetřování několika druhů zvířat (losa evropského, daňka evropského, jelena evropského a prasete divokého) zjistili, že 40 % (14/36) zvířat nese protilátky proti trypanosomám, tedy se s nimi někdy setkalo.

Pro detekci trypanosom v přenašeči je často využívána pitva střeva a následná mikroskopie, popřípadě kultivace. Recentní studie často využívají taktéž molekulární metody s pomocí specifických primerů. Mikroskopie střeva nese výhody popisu infekce ve střevě a detekci vývojových stádií, ale morfologické určení je obtížné, a proto bývá pitva doprovázena následující sekvenací. Využitím PCR a sekvenace se ulehčuje určení parazitů a odhalení smíšených infekcí, ale nepotvrzuje výskyt vývojových stádií a neodhaluje schopnost vektora podílet se na přenosu (Davies a Clark 1974; Krinsky a Pechuman 1975; Calzolari et al. 2018; Schoener et al. 2018; Ganyukova et al. 2018; Werszko et al. 2019).

## 2.7. Vliv teploty na vývoj patogenů v hostiteli

Po nasátí trypanosom vektorem má environmentální teplota vliv na rychlost trávení krve i na vývoj patogenů ve střevě. Rychlost trávení se zrychluje se stoupající teplotou, a naopak při nižších teplotách je trávení pomalejší a dochází k pozdější defekaci i kladení

vajec (Benková a Volf 2007; Hlaváčová et al. 2013; McCue et al. 2016). Teplota ovlivňuje vývoj patogenů ve střevě, možnosti uchycení či invazi stěny střeva a přenos na nového hostitele (Githeko et al. 2000; Gage et al. 2008; Hlaváčová et al. 2013; Reinhold et al. 2018).

Vliv teploty na vývoj ve vektorech byl prokázán u různých protozoí, například u plasmodií, leishmanií či trypanosom (Asin a Catalá 1995; Paaïjmans et al. 2012; Hlaváčová et al. 2013). Vliv teploty byl sledován u komárů *Anopheles stephensi* nakaženými *Plasmodium yoelii*. Vektorová kompetence komárů klesala s narůstající okolní teplotou, kdy se sice zvýšila rychlost vývoje plasmodií, ale výsledná prevalence u komárů byla nižší než v chladnějších teplotách (Paaïjmans et al. 2012).

Hlaváčová et al. (2013) studovali vliv teploty na vývoj leishmanií u flebotomů *Phlebotomus perniciosus* a *Lutzomyia longipalpis*. U flebotomů chovaných při nižších teplotách bylo zpomalené trávení krve i vývoj parazitů ve střevě. Díky pomalejšímu trávení získávají parazité více času pro uchycení ve střevě a tím jsou chráněni před defekací.

U sterkorálních trypanosom *Trypanosoma cruzi* byl sledován vliv okolní teploty v *Triatoma infestans*. V nižších teplotách docházelo k pomalejšímu nárůstu počtu epimastigotů ve střevě ploštic než ve vyšších teplotách, ve kterých byly ploštice po sání chovány. V nižších teplotách byl taktéž pozorován pozdější výskyt metacyklů (Asin a Catalá 1995).

Teplota, ve které se nachází přenašeč po sání na hostiteli ovlivňuje jak samotné trávení krve, tak i vývoj a množení patogena v přenašeči. Environmentální teplota má vliv na vektorovou kompetenci a působí i na dobu, kdy začne být vektor infekční pro hostitele.

## **2.8. Diureze a prediureze u krevsajícího hmyzu**

Vylučování vody u krevsajícího hmyzu je děleno na prediurezi, která probíhá během sání na hostiteli, a diurezi, jež zahrnuje vylučování moči již po skončení sání krve. Vylučování pomáhá hmyzu zbavit se přebytečné vody, zahušťuje potravu a pomáhá tak získat více důležitých živin (Nijhout a Grant 1978; Briegel a Rezzonico 1985). Diureze byla popsána u různých druhů krevsajícího hmyzu. Je známa u ploštic, glossin, flebotomů i komárů (Maddrell 1964; Gee 1975; Nijhout a Grant 1978; Jones a Brandt 1981; Sádlová et al. 1998). U komárů je vylučování kontrolováno diuretickým hormonem a množství vyloučené moči je závislé na množství nasáté krve (Nijhout a Grant 1978).

Diureze probíhá vylučováním kapek moči, první kapka může někdy obsahovat krvinky, a proto je označována jako rektální tekutina (Briegel a Rezzonico 1985; Sádlová 1998). Role prediureze v kontaminativním přenosu parazitů je dobře známá u *T. cruzi*, ale byla zkoumána také u *Leishmania major*, kdy byly metacykly pozorovány ve vylučované tekutině a pomocí kultivace byla prokázána i jejich životaschopnost a infekční potenciál (Sádlová a Volf 1999).



### 3. METODIKA

#### 3.1. Získávání hmyzu a jeho determinace

##### 3.1.1. Odchyt a determinace komárů

Odchyty krevsajícího hmyzu byly prováděny pravidelně na třech lokalitách (obrázek 3.1), jednou za měsíc od května do srpna v letech 2017-2019 v Milovickém lese (Jihomoravský kraj), v Zeměchách a Chotči (Středočeský kraj). Tyto tři lokality se liší svým biotopem. V Milovickém lese je poměrně sucho, ale nacházejí se zde umělá vodní napajedla a je zde chována jelenovitá zvěř. Zeměchy jsou lokalita s potůčkem, který je za letních měsíců spíše bahnitý. Choteč je z těchto lokalit nejsušší, nejbližší vodní zdroj je asi jeden kilometr vzdálený Radotínský potok (obrázek 3.2).



**Obrázek 3.1:** Mapa s vyznačenými lokalitami odchyty komárů. Převzato a upraveno z (Slepá mapa krajů, Mapa České republiky [online]).



**Obrázek 3.2:** Fotografie lokalit odchyty komárů (Foto AB). **A** – Choteč, **B** – Zeměchy, **C** – Mikulov

Při pravidelných odchycích byly pasti dávány na stejná místa po všechny sezóny. Pokládány byly odpoledne mezi 16. a 18. hodinou a sbírány byly následující den mezi 8. a 10. hodinou. Dále probíhaly mimořádné odchyty v červenci roku 2018 a 2019 v okolí Mikulova včetně Milovického lesa, kdy část komárů byla pitvána a část byla zpracována jako komáři z pravidelných odchytů (viz dále).

Hmyz byl chytán šesti CDC pastmi s CO<sub>2</sub> jako atraktantem ve formě suchého ledu, který byl dáván do 1,4 l termosek. Oxid uhličitý se z termosek uvolňoval přes hadice s vnitřním průměrem 1,2 cm k větráčkům, na kterých byly upevněny kovové konstrukce s navázanými sítěmi. Přilákaný hmyz byl díky větráčkům proudem vzduchu nasát do sítí (obrázek 3.3).



**Obrázek 3.3:** Instalovaná CDC past (Foto AB)

Odchycení komáři z lokalit Zeměchy a Choteč byly v sítích usmrceni v mrazáku při teplotě -80 °C a před dalším zpracováním byli uchovávaní v Petriho miskách v mrazáku s teplotou -20 °C. Hmyz odchycený v Milovickém lese byl usmrcován pomocí suchého ledu a do laboratoře byl převážen v Petriho miskách přechovávaných u suchého ledu. Před dalším zpracováním byli komáři pomocí binokulární lupy determinováni do druhu pomocí klíče Fauna ČSR (Kramář 1958).

Hmyz z roku 2017 mi byl poskytnut již odchycený a účastnila jsem se pouze jeho determinace a dalšího zpracování. Aktivně jsem se účastnila odchytů a zpracování komárů v letech 2018 a 2019 společně s Mgr. Magdalénou Fialovou.

### 3.1.2. Sběr a determinace klošů

Po domluvě s majiteli ovcí či myslivci byli kloši získáváni sběrem ze zvěře na různých lokalitách v České republice. Lokality jednotlivých sběrů jsou uvedeny v následujících tabulkách 3.1 a 3.2. Ovčí kloši byli sbíráni v letech 2017 – 2018, jelení kloši v letech 2018 – 2019.

**Tabulka 3.1:** Seznam lokalit a hostitelé klošů *Lipoptena* spp.

Kraj	Obec	Druhy zvířat
Jihočeský	Boršov nad Vltavou	daněk evropský, srnec obecný
	České Budějovice	neuvedeno
Jihomoravský	Mikulov	daněk evropský, jelen evropský
Liberecký	Blíževedly	srnec obecný
	Hvězda, Blíževedly	
	Skalka, Blíževedly	
	Litice, Blíževedly	daněk evropský
Plzeňský	Planá	srnec obecný
Středočeský	Bystřice	srnec obecný
	Neveklov	
	Nové Strašecí	jelen evropský
	Obecnice	daněk evropský
	Vonoklasy	srnec obecný

**Tabulka 3.2:** Seznam lokalit odchytu kloše *Melophagus ovinus*.

Kraj	Obec
Jihočeský	Vlkov
Jihomoravský	Ratíškovice
Královohradecký	Hořice
Středočeský	Statenice
Zlínský	Valašská Senice

Zatímco na ovcích se vyskytuje pouze *Melophagus ovinus*, na jelenovité zvěři se v České republice vyskytují dva druhy, *Lipoptena fortisetosa* a *L. cervi*. Determinace těchto klošů probíhala pomocí klíče (Chvála et al. 1980a). Po určení do druhu byli živí kloši vypitváni pod binokulární lupou (popis pitvy v následující kapitole), z mrtvých jedinců byla vyizolována DNA a detekce trypanosom probíhala pomocí PCR.

### 3.1.3. Odchyt a determinace ovádů

Ovádi byli odchytáváni v Milovickém lese a v okolí Mikulova v červenci 2019. Byli získáváni buď ze sítěk při odchycích komárů nebo ze sítí během odchytů ptáků. Tito ovádi byli determinováni pomocí klíče (Chvála et al. 1980b) a následně bylo vypitváno střevo (popis pitvy v následující kapitole)

## 3.2. Pitva živého hmyzu a zpracování pozitivních nálezů

Chemikálie:

- Fyziologický roztok (Braun)
- Čistý 70% ethanol

Kloši byli usmrceni v ethanolu a dvakrát omyti ve fyziologickém roztoku, poté byli determinováni do druhu. Ovádi byli nejdříve určováni a poté usmrceni a omyti. Před pitvou komárů z terénu se nejdříve část komárů ze sítě vyfoukala pomocí exhaustoru do mističek na ledu. Díky nízké teplotě byli komáři uspáni a pomocí klíče mohli být determinováni do druhu. Teprve poté byli komáři usmrceni v ethanolu a dvakrát omyti ve fyziologickém roztoku. U pitvy komárů z membránového sání byli komáři uspáni v mističkách na ledu a byli rovnou pitváni.

Pitva probíhala pod binokulární lupou na podložním sklíčku v kapce fyziologického roztoku pomocí špičatých pinzet. Nejdříve byla odstraněna hlava a poté bylo vytaženo střevo s posledním zadečkovým článkem. Sklíčka s vypitvaným střevem byla přechovávána ve vlhké komůrce, než byla prohlížena v mikroskopu.

Pod mikroskopem byla sledována přítomnost bičíkovců ve střevě. U pozitivních vzorků bylo popsáno, v které části střeva se prvoci vyskytují, v jakém množství a zda se jednalo o volné bičíkovce či rozetovité útvary uchycené ke stěně střeva. Intenzita infekce ve střevě byla popisována systémem křížků, který je definovaný v následující tabulce 3.3.

**Tabulka 3.3:** Popis intenzity infekce ve střevě hmyzu.

Počet křížků	Počet bičíkovců ve střevě
x	0 – 100
xx	100 – 1000
xxx	1000 a více

U hmyzu získaného z terénu byla při pozitivním nálezů část střeva uchována v ethanolu na pozdější detekci pomocí PCR. Další část pozitivního střeva byla pomocí inzulinové injekční stříkačky roztrhnuta a okolí bylo nasáto do stříkačky s izolačním médiem, které bylo následně inokulováno do PEN zkumavek s krevním agarem (podrobnější informace o médiích v kapitole 3.3). Kultivační PEN zkumavky byly uchovávány v pokojové teplotě při pitvách v terénu a po převozu do laboratoře byly v teplotě 23 °C v inkubátoru. Podle potřeby byly kultury kontrolovány, minimálně jednou za týden po dobu tří týdnů. Při kontrolách bylo malé množství média z PEN zkumavky nasáto do inzulinové stříkačky a bylo nanášeno na podložní sklo, které bylo kontrolováno pod inverzním mikroskopem. Pokud nebyli zaznamenáni bičíkovci ani po třech týdnech, byly vzorky prohlášeny za negativní. U pozitivních nálezů bez kontaminací se sledoval dostatečný růst kultury až do přeočkování do dvou kultivačních zkumavek s krevním agarem a 1 ml izolačního média. Tyto kultury byly přechovávány v inkubátoru se stejnou teplotou a docházelo ke kontrolám minimálně jednou za tři dny, dokud dostatečně nenarostly. Jedna zkumavka byla určena ke sklizení buněk na izolaci DNA a ocharakterizování sekvenací. Druhá sloužila pro zamrazení kultury a uchovávání v kryobance.

Pozitivní sklíčka z pitev se střevy se ponechala vyschnout, byla nafičována methanolem a uložena do krabiček pro případné další prozkoumání.

### **3.3. Krevní vzorky a jejich zpracování**

Krevní vzorky byly získávány z rány odstřelené zvěře. Krev byla odebírána do 1,5 ml zkumavek s ethanolem pro pozdější PCR detekci nebo byla krev odebírána do stříkaček s izolačním médiem. Krevní vzorky byly využity pro detekci pomocí kultivace i PCR. V tabulce 3.4 jsou vypsané lokality a druhy zvířat, z kterých byly vzorky krve odebrány. Tyto krevní vzorky byly získané v letech 2017 – 2019.

**Tabulka 3.4:** Původ krevních vzorků.

Kraj	Obec	Druhy zvířat
Liberecký	Blíževedly	srnec obecný
	Hvězda	
	Skalka	
Karlovarský	Doupov	jelen evropský
Středočeský	Kublov	jelen evropský
	Nižbor	
Jihomoravský	Mikulov	jelen evropský, daněk evropský
Jihočeský	Nové Hradky	jelen evropský

### 3.4. Kultivace

Trypanosomy byly v laboratoři kultivovány v kultivačních zkumavkách s plochým dnem, tzv. flat tubes. V terénu byli bičíkovci ze střev očkováni do PEN zkumavek, které byly uchovávány taktéž naležato.

Zkumavky obsahovaly tekutou složku média a pevnou složku v podobě krevního agaru. Byly využívány dva typy tekutých médií, kultivační a izolační. Tato média byla připravena předem a uchovávána v lednici. Krevní agar se připravoval předem do kultivačních nádob, které byly přechovávány v chladu v lednici.

Do zkumavek s agarem se přidalo médium, které se naočkovalo izolátem. Naočkované zkumavky byly ponechávány v inkubátoru při teplotě 23 °C a byly kontrolovány minimálně jednou za tři dny či jednou týdně u kontrol PEN zkumavek z terénu. Kontroly probíhaly pomocí inverzního mikroskopu, kdy zkumavky s plochým dnem byly prohlíženy skrze stěnu. Kontroly PEN zkumavek jsou již popsány výše v kapitole 3.2.1.

#### 3.4.1. Příprava pevné složky

Složení a množství jednotlivých částí krevního agaru jsou rozepsány v tabulce 3.5. Pevné složky byly odváženy na vahách a smíchány s vodou. Směs byla na 25 minut vložena do autoklávu na teplotu 120 °C a poté byla ponechána vychladnout přibližně na 40 °C. V prostředí flowboxu byla směs smíchána s defibrinovanou krví a postupně byla rozpipetována po 0,5 – 0,7 ml do PEN zkumavek či po 1 ml do kultivačních zkumavek. Naplněné zkumavky s krevním agarem se nechaly ztuhnout v šikmé poloze.

**Tabulka 3.5:** Složení krevního agaru.

Složka	Množství
Neopepton	2 g
NaCl	0,6 g
Agar	2 g
Destilovaná voda	100 ml
Defibrinovaná krev	25 ml

### 3.4.2. Příprava tekuté složky

#### Kultivační R + S médium

Toto médium bylo využíváno na kultivaci čistých kultur, které byly vymrazeny z kryobanky. Složení kultivačního média je podrobněji rozepsané v následující tabulce 3.6. Podle potřebného množství byl v prostředí flowboxu nejdříve namíchán roztok dvou médií RPMI-1640 Medium (Sigma) a Schneider's Insect Medium (Sigma) v poměru 1:1. Do inaktivovaného fetálního séra se přidala přefiltrovaná moč (Millex-GP Syringe Filter Unit, 0,22 µm), amikin a tato směs byla do určeného objemu doplněna připraveným roztokem z médií.

**Tabulka 3.6:** Složení kultivačního média.

Složka	Množství
RPMI-1640 Medium (Sigma):Schneider's Insect Medium (Sigma)	v poměru 1:1
Inaktivované Phetal Bovine Serum (Gibco)	10 % objemu
Amikin	50 – 100 µg·ml <sup>-1</sup>
Sterilní lidská moč	2 % objemu

#### Izolační médium

Toto médium obsahuje větší množství bakteriocidních a fungicidních složek než kultivační médium R + S, a proto bylo používáno na kultivaci izolátů z hmyzích preparátů, krevních vzorků či pro přeočkování z PEN zkumavek z terénu. V tabulce 3.7 je podrobně rozepsané složení tohoto média. Při přípravě byl nejdříve navážen 5-fluorocytosin, který byl rozpuštěn v části roztoku RPMI-1640 Medium a Grace's Insects Medium, které bylo namícháno v poměru 1:1 podle potřebného množství. Po rozpuštění 5-fluorocytosinu se směs přefiltrovala (Millex-GP Syringe Filter Unit, 0,22 µm) do inaktivovaného fetálního bovinního séra, přidal se amikin, penicilin, přefiltrovaná moč a nakonec se do určeného objemu dolil roztok RPMI:Grace's Insects.

**Tabulka 3.7:** Složení izolačního média.

Složka	Množství
RPMI-1640 Medium (Sigma):Grace's Insects Medium (Sigma)	poměr 1:1
Inaktivované Phetal Bovine Serum (Gibco)	20 % objemu
Amikin	100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
Penicilin	5 000 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$
5-fluorocytosin	1,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$
Sterilní lidská moč	2 % objemu

### 3.5. Sklizení, zamrazování a vymrazování kultur

Chemikálie:

- Fyziologický roztok
- DMSO (dimethylsulfoxid)

Pro sklizení kultury bylo médium s prvky přeneseno Pasteurovou pipetou do 1,5 ml zkumavky. Kultura byla následně stočena na 6000 rpm po dobu pěti minut v centrifuze. Supernatant byl odpipetován a pro přečištění kultury od média byli usazení bičíkovci promícháni na vortexu s 1 ml fyziologického roztoku. Tato suspenze byla opět stočena v centrifuze za stejných podmínek. Promytí izolátu probíhalo celkem třikrát. Nakonec po posledním stočení se opět odpipetoval supernatant a usazená kultura byla do doby izolace DNA přechovávána v mrazáku v teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Na přípravu kultury k zamrazení bylo nejdříve potřeba ve sterilním prostředí flowboxu slít kulturu do 15 ml centrifugační zkumavky, kam bylo následně napipetováno DMSO (dimethylsulfoxid) v množství 5 – 10 % objemu. Poté byla kultura Pasteurovou pipetou promíchána a rozpipetována cca po 0,5 ml do čtyř popsaných mikrozkuvek určených pro zamrazování do tekutého dusíku. Mikrozkuvky byly uloženy do speciálních boxů (NUNC), aby docházelo k postupnému a rovnoměrnému zamrazování v  $-80^{\circ}\text{C}$  mrazáku, kde byly kultury ponechány minimálně 24 hodin. Poté byly mikrozkuvky přemístěny do tekutého dusíku, kde jsou uchovávány. Pro každou kulturu byl speciálně vyplněn papír s popisem označení, typem pasáže, datem a místem uložení, datem a místem původu kultury a počtem mikrozkuvek v kryobance.

Při vymrazování kultury byly ve flowboxu připraveny dvě kultivační zkumavky s krevním agarem a 1 ml kultivačního média. Po vyndání kultury z dusíku, bylo u zkumavky povoleno víčko a kultura byla odložena na stůl, aby z ní mohl vyprchat



přebytečný dusík ze zkumavky. Poté bylo víčko dotaženo a zkumavka s kulturou byla vložena do nádoby s vodou o teplotě cca 37 °C, aby došlo k rychlejšímu roztání. Rozmrznutý izolát ve zkumavce byl ve flowboxu naočkován do připravených kultivačních zkumavek.

Do protokolu daného izolátu byl zapsán den vymražení a účel využití kultury.

### **3.6. Přečišťování kultur**

#### **Chemikálie**

- Ředící roztok (1% formaldehyd a 0,85% NaCl)
- Izolační médium

V případě, že byla kultura kontaminovaná kvasinkami a zároveň byl cíl daný izolát využít na experimentální sání, byla snaha kulturu přečistit. Přečišťování probíhalo pomocí migrační U-trubice nebo klonováním na destičce. Při těchto pokusech bylo používáno izolační médium, které obsahuje fungicidní a baktericidní látky.

Přečišťování pomocí migrační trubice bylo připravováno ve flowboxu, kdy se do skleněné sterilizované trubice tvaru U napipetovalo izolační médium do výše asi 2 cm nad ohyb trubice. Poté pomocí Pasteurovy pipety byla přenesena kapka kontaminované kultury do jednoho vývodu trubice. Oba konce trubice byly zavíčkované a trubice byla přes noc stabilně uložena. Následující den se ve flowboxu z druhého hrdla, než byla kultura nakapána, odebrala malá povrchová část média a ta se naočkovala do připravených kultivačních zkumavek s izolačním médiem. Tyto zkumavky byly uchovávány v inkubátoru s teplotou 23 °C a byly kontrolovány na přítomnost kvasinek.

V případě klonování byla využívána destička s jamkami, do kterých se nanášelo 100 µl naředěné kultury. Kontaminovaná kultura se nejdříve spočítala v Bürkerově komůrce. V 1,5 ml zkumavce se smíchalo 10 µl kultury a 990 µl ředícího roztoku, po promíchání bylo z každé strany napipetováno do komůrky 10 µl tohoto roztoku. Buňky byly počítány v pěti polích na každé straně, což celkově odpovídalo počtu buněk v 1 µl. Toto množství bylo přepočítáno na celkový objem narostlé kultury. Kultura byla poté rozředěna izolačním médiem a napipetována do destičky. Destička byla uchovávána v inkubátoru s teplotou 23 °C a kontrolována byla na inverzním mikroskopu.

### 3.7. Izolace DNA

Chemikálie:

- ROCHE High Pure PCR Template Preparation Kit
- Ethanol 99,8% (Lach-Ner)
- 2-propanol (Sigma)
- PCR dH<sub>2</sub>O na rozředění proteinázy K (TopBio)
- Fyziologický roztok

Izolace DNA probíhala pomocí ROCHE High Pure PCR Template Preparation Kit podle protokolu Isolation of Nucleic Acids from Mammalian Tissue. Takto připravená DNA byla popsána a uskladňována pro další použití v mrazáku při teplotě – 20 °C. Izolace byla prováděna ze získaného mrtvého hmyzu, z pozitivních vypitvaných střev, krevních vzorků a sklizených kultur. U hmyzu docházelo ke zpracování v poolech, kdy maximální počet na jeden vzorek byl deset komárů nebo pět klošů daného druhu sesbíraného z jednoho zvířete, popřípadě stáda u ovčí. Výjimku tvořil hmyz, který z nedostatku určovacích znaků byl zpracováván společně v rámci rodů. Pro všechny vzorky byl použitý stejný postup, v případě krevních vzorků někdy docházelo ke špatnému průniku tekutiny přes kolonku. V takovém případě se nechaly kolonky stočit na centrifuze opakovaně. U hmyzu docházelo k narušení jejich těla ve zkumavkách před přidáním proteinázy K pomocí sterilizovaných homogenizačních tyčinek. U krevních a střevních vzorků uchovávaných v ethanolu byl před izolací nejdříve odpařen alkohol na termobločku při teplotě 37 °C. Kloši uchovávaní v alkoholu byli ponecháni k vyschnutí na ubrousku a následně byli třikrát promyti v 1 ml fyziologického roztoku.

### 3.8. Detekce trypanosomatid z izolované DNA

Chemikálie:

- EmeraldAmpGT PCR Master Mix (TaKaRa)
- PPP Master Mix (Top-Bio)
- PCR dH<sub>2</sub>O (TaKaRa), dH<sub>2</sub>O (TopBio)
- Primer (Sigma)
- DNA

Po vyizolování DNA byla prováděna PCR detekce trypanosomatid, a to pomocí klasické PCR u DNA získané z kultur nebo pomocí nested PCR u vzorků získaných z hmyzu, střev či krve. Následně probíhala elektroforéza a u pozitivních vzorků docházelo k přečištění PCR produktu pomocí ExoSAP. Poté byly vzorky připraveny k sekvenaci malé ribosomální podjednotky a samotná sekvenace probíhala v Laboratoři sekvenace DNA. Sekvence byly zpracovávány pomocí programů v počítači či na internetových stránkách. V následující tabulce 3.8 jsou uvedeny použité primery pro obě PCR a v tabulce 3.9 primery použité do reakce pro sekvenace. Pro PCR byly primery ředěny vodou v poměru 10 µl primer a 90 µl vody, do reakce na sekvenaci bylo používáno ředění 5 µl primer a 95 µl vody.

**Tabulka 3.8:** Použité primery pro detekci SSU rRNA trypanosomatid.

Typ PCR		Název	Sekvence	Zdroj
Klasická PCR		MedA – F	CTGGTTGATCCTGCCAG	Medlin et al. 1988
		MedB – R	TGATCCTTCTGCAGGTCCACCTAC	
Nested PCR	1.krok	S762 – F	GACTTTTGCTTCCTCTAWTG	Maslov et al. 1996
		S763 – R	CATATGCTTGTTTCAAGGAC	
	2.krok	TRnF2	GARTCTGCGCATGGCTCATTACATCAGA	Votýpka et al. 2015
		TRnR2	CRCAGTTTGATGAGCTGCGCCT	

**Tabulka 3.9:** Primery používané k sekvenaci SSU.

Název	Sekvence	Zdroj
577F	GCCAGCACCCGCGGT	Zídková et al. 2012
577R	ACCGCGGGTGCTGGC	
1 000F	CGATCAGATACCGCCCTAGTTC	Votýpka nepublikováno
1 000R	GAAGTAGGGCGGTATCTGATCG	
1 510F	CAGGTCTGTGAYGCTG	Zídková et al. 2012
1 510R	CAGCRTACAGACCTG	

### 3.8.1. Klasická PCR

Tato PCR probíhala v jednom kroku a byla prováděna u DNA získané z kultur, kdy ve vzorku bylo velké množství DNA parazita a mohly se použít méně specifické primery. V tabulce 3.10 jsou vypsány jednotlivé složky jdoucí do reakce spolu s jejich množstvím. V tabulce 3.11 je vyobrazen cyklus PCR reakce. Při každé reakci byla využívána pozitivní kontrola ve formě DNA z leishmanií, aby mohlo být kontrolováno, že reakce probíhala správně. Minimálně každý jedenáctý vzorek byla negativní kontrola.

**Tabulka 3.10:** Složení reakční směsi pro klasickou PCR.

Složka	Objem
EmeraldAmP	11,5 µm
PCR voda	11,5 µm
Primer mix – MedA/MedB	1 µm
DNA	1 µm

**Tabulka 3.11:** Cyklus reakce klasické PCR.

Počet opakování	Teplota	Čas
1x	94 °C	5 min
30x	94 °C	1 min
	55 °C	1,5 min
	72 °C	1,5 min
1x	72 °C	5 min

### 3.8.2. Nested PCR

Nested PCR probíhala ve dvou krocích. Byly používány specifitější primery, které byly citlivější pro detekci SSU rRNA trypanosomatid, kde se ve vzorku vyskytovala i DNA hostitele. Ze začátku bylo do reakce využíváno míchání EmeraldAmP s vodou v poměru 1:1, později v rámci úspory byl poměr upraven s ohledem na zachování funkčnosti PCR reakce na 2:3. Složení reakční směsi je znázorněno v tabulce 3.12 pro první krok a 3.13 pro druhý krok. Průběh cyklu reakce prvního kroku je vypsán v tabulce 3.11, který je stejný jako cyklus klasické PCR s MedA/MedB primery. Pro druhý krok je cyklus vypsán v tabulce 3.14. Kromě EmeraldAmP byl někdy využíván v druhém kroku Master Mix, který byl míchán s vodou v poměru 1:1, ale jelikož s ním ne vždy proběhla PCR reakce správně, byl následně pouze používán EmeraldAmP.

Pro každou reakci byla používána pozitivní kontrola ve formě DNA z leishmanií, jako u klasické PCR a taktéž byly používány negativní kontroly minimálně každý jedenáctý vzorek.

**Tabulka 3.12:** Složení reakční směsi pro nested PCR 1.kroku.

Složka	Objem (1:1)	Objem (2:3)
EmeraldAmp	7 µm	5 µm
PCR voda	7 µm	9 µm
Primer mix S762/763	1 µm	1 µm
DNA	1 µm	1 µm

**Tabulka 3.13:** Složení reakční směsi pro nested PCR 2.kroku.

Složka	Objem (1:1)	Objem (2:3)
EmeraldAmp	11 µm	9 µm
PCR voda	11 µm	13 µm
Primer mix TRnF2/R2	1 µm	1 µm
DNA	1 µm	1 µm

**Tabulka 3.14:** Cyklus PCR reakce pro 2.krok nested PCR.

Počet opakování	Teplota	Čas
1x	94 °C	5 min
30x	94 °C	1 min
	64 °C	1,5 min
	72 °C	1,5 min
1x	72 °C	5 min

### 3.8.3. Elektroforéza PCR produktu

Chemikálie:

- Agaróza (Sigma)
- 50X TAE Electrophoresis Buffer (Thermo Scientific)
- SYBR Safe DNA gel stain (Thermo Scientific)
- GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (BioLabs, Fermentas)
- dH<sub>2</sub>O

Důležitou součástí detekce trypanosomatid byla horizontální elektroforéza, díky níž mohlo být vizualizováno, zda došlo ve vzorku při PCR k amplifikaci, a tudíž se jednalo o pozitivní vzorek s DNA trypanosomatid.

Pro elektroforézu byl připravován 1% agarózový gel, do kterého byl přidáván Syber Safe v množství 1 µl na 1 ml gelu. Syber Safe byl důležitý pro viditelnost DNA pod UV a modrým světlem při detekci pozitivních vzorků.

Do první jamky byl jako marker používán GeneRuler, který sloužil pro zjištění velikosti DNA. Do gelu bylo pipetováno 7 µl markeru. Následně byly napipetovány po 10 µl PCR produkty, negativní a pozitivní kontroly. Po elektroforéze byl gel prohlížen v UV transiluminátoru.

#### 3.8.4. Přečištění PCR produktu ExoSAP

Chemikálie:

- ExoSAP (Thermo Scientific)
- dH<sub>2</sub>O (TopBio)
- PCR produkt

Pozitivní vzorky na elektroforéze byly před posláním na sekvenaci přečišťovány pomocí enzymu ExoSAP. Na ledu bylo smícháno ve flowboxu 5 µl PCR produktu s 1 µl enzymu. Následně byly vzorky vloženy do termocycleru na cyklus, který je popsán v následující tabulce 3.15.

**Tabulka 3.15:** Cyklus pro přečištění PCR produktu pomocí ExoSAP.

	<b>Teplota</b>	<b>Čas</b>
Inkubace	37 °C	8 min
Denaturace	80 °C	2 min
Zchlazení	4 °C	∞

#### 3.8.5. Sekvence a zpracování sekvencí

Po přečištění byla DNA namíchána ve sterilních 200 µl mikrozkuvkách spolu s vodou a primery určenými do reakce pro sekvenaci. Celkový objem pro sekvenaci byl 8 µl, objem jednotlivých složek do reakce je vypsán v tabulce 3.16. V případě, že na elektroforéze byl vidět slabý proužek, tj. menší množství naamplifikované DNA, bylo do reakce dáno více DNA a méně vody. Na sekvenaci DNA trypanosomatid byl používán do reakce primer 1 000R, výsledná délka sekvence byla kolem 600 bp. V případě, že byly potřeba delší sekvence daného vzorku, byly využívány ještě primery 577F, 577R, 1 000F, 1 510F a 1 510R.

**Tabulka 3.16:** Složení vzorků jdoucí do reakce pro sekvenování.

Složka	Objem
DNA	1 – 2 $\mu\text{m}$
Voda	6 – 5 $\mu\text{m}$
Primer	1 $\mu\text{m}$

Takto namíchané vzorky byly posílány do Laboratoře sekvenace DNA sídlící v BIOCEVu (Vestec), odkud nám byly zasílány výsledky elektronicky. Sekvence byly následně zpracovávány pomocí programu Geneious s licencí od UK (Kearse et al. 2012). V programu byly sekvence upraveny a následně pomocí algoritmu BLAST byly nalezeny příbuzné sekvence z veřejné databáze GenBank.

### 3.9. Fylogenetické zpracovávání sekvencí

Ze získaných upravených sekvencí *T. theileri* byl připraven dataset, ke kterému byly vybrány a přidány příbuzné sekvence z databáze GenBank. Jako outgroup fylogenetického stromu byly zvoleny *T. cyclops* (AJ131958), *T. avium* (KT728402), *T. grayi* (KF546526), *T. microti* (AJ009158), a *T. conorhini* (AJ012411). Připravený dataset byl zalignován pomocí MAFFT (Katoh et al. 2002), s algoritmem G-INS-i a parametry 200PAM/ $\kappa$  = 2, penaltou za první mezeru 1,53, offset value 0,0 a s vyřazováním neurčitých nukleotidů z alignmentu (nzero). Datasetový alignment byl ořezán a upraven v programu BioEdit (Hall 2011).

Fylogenetická analýza a příprava fylogenetického stromu probíhala pomocí programu RAxML (Stamatakis 2014) a výsledný strom byl prohlížen v aplikaci FigTree (Rambaut 2014). Při analýze byl použit model GTRGAMMAI, kdy v zadání bylo nalezení nejlepšího stromu mezi 100 analyzovanými. V dalším kroku byly pomocí programu RAxML vypočítány bootstrapy. Strom byl upravován v TreeView (Page 1996) a k příslušným větvím byly v CorelDrawX8 přidány bootstrapy větší než 50 a byly provedeny detailní úpravy popisků a vzhledu stromu.

### 3.10. Výpočet prevalence

Jelikož byl hmyz většinou zpracováván v poolech, byla prevalence počítána pomocí koeficientu MIR. Při tomto výpočtu se počítá s tím, že v pozitivním poolu se vyskytuje pouze jeden pozitivní jedinec.

$$\text{MIR (\%)} = \frac{\text{počet pozitivních poolů}}{\text{celkový počet zpracovaných jedinců}} \cdot 100$$

### 3.11. Membránové sání

K infekčnímu sání byli využíváni komáři druhu *Culex pipiens quinquefasciatus*, *Culex pipiens molestus* a *Aedes aegypti*. Dále proběhlo dvakrát sání s *Phlebotomus perniciosus*. Při experimentálním sání bylo využíváno kolem 100 samic komárů či flebotomů.

V rámci pokusů byli nejdříve využíváni komáři rodu *Culex*, jelikož se nacházejí ve stálých chovech katedry Parazitologie. Poněvadž při experimentech byly s *Culex* většinou negativní výsledky, přešlo se na pokusy s *Ae. aegypti*, kteří byli získáni ze Státního zdravotního ústavu a byl založen dočasný chov tohoto druhu na katedře.

#### 3.11.1. Chovy komárů

Komáři byli chováni v sítích při teplotě 26 °C a vlhkosti 60 %. Jako potravu dostávali 50% roztok sacharózy ve vatě třikrát týdně v Petriho miskách. Pro rozmnožování kolonie byly samice ponechány se nasát na uspaných laboratorních myších BALB/c, které byly chovány pro každou kolonii zvlášť. Na kladení vajíček u komárů rodu *Culex* byla určena mistička s vodou a nakladená vajíčka byla poté přelita do mísy s odstátou vodou pro každou kolonii zvlášť, kde se líhly a vyvíjely larvy. Komáři *Aedes* měli na kladení k dispozici misku s vlhkým filtračním papírem s trochou vody na dně misky. Vajíčka byla následně ponechána týden k vyschnutí a poté vložena do mísy s odstátou vodou. Larvy komárů byly vyživovány krmivem pro akvarijní ryby (Tetramin) minimálně třikrát týdně. Vyvinuté kukly z larev byly přenášeny do mističek pomocí Pasteurových pipet. Misky s kuklami byly ponechávány v sítích každé kolonie. U komárů rodu *Culex* byly misky zakryté pouze s menším otvorem pro vyletování dospělých jedinců, aby samice nekladly do této misky vajíčka. Používané nástroje pro chovy byly oddělené pro každou kolonii, aby nedocházelo k případným přenosům infekcí či náhodnému křížení kolonií.

#### 3.11.2. Chovy flebotomů

V této diplomové práci byli využiti flebotomové druhu *P. perniciosus*, ze stálých chovů na katedře Parazitologie.

Larvy flebotomů jsou chovány ve vysádrovaných kelímcích, které udržují a poskytují vlhkost. Jako potrava pro larvy slouží směs pelet a králíčích exkrementů. Larvy se v kelímcích kuklí a následně se z nich líhnou dospělci. Dospělci jsou chováni v sítích,



jako zdroj potravy jim slouží sacharózový roztok napuštěný ve vatě a pro množení kolonie jim je poskytnutý zdroj krve (Volf a Volfova 2011; Lawyer et al. 2017).

### 3.11.3. Průběh sání

Pro membránové sání bylo potřeba předem připravit:

- Kuřecí kůžičku
- Inaktivovat krev
- Připravit kulturu
- Den předem odebrat komárům/flebotomům cukr

Chemikálie:

- Fyziologický roztok
- 70% ethanol
- Ředící roztok (1% formaldehyd a 0,85% NaCl)

Jako membrána pro infekční sání byla používána kůžička z asi tři dny starých kuřat kura domácího (*Gallus domesticus*). Při přípravě byla nejdříve kuřata zbavena peří na zádech. Poté ve flowboxu byla z kuřat sterilními nástroji opatrně odstřižnuta a stažena kůžička, která byla dvakrát promyta v 70% ethanolu a třikrát ve fyziologickém roztoku. Takto omyté kůžičky byly rozprostřeny do Petriho misek a uchovávány v mrazáku s teplotou -20 °C.

Pro infekční sání byla používána defibrinovaná králíčí nebo beraní krev, u které bylo nutno před použitím zinaktivovat komplement. Potřebné množství krve bylo Pasteurovou pipetou dáno do 15 ml zkumavky. Tato krev byla deaktivována ve vodní lázni v 56 °C minimálně 35 minut.

Přibližně dva týdny před sáním byla vybraná kultura vymrazena a po dostatečném nárůstu byla ještě přeočkována, aby v médiu nebyl přebytečný DMSO ze zamrazování a izolát se nechal narůst. Před samotným sáním bylo nejdříve potřeba spočítat množství buněk v kultuře, aby se mohla stanovit infekční dávka podávaná v krvi komárům. Infekční dávka se pohybovala kolem  $10^7$  buněk/ml. Počítání probíhalo pomocí Bürkerovy komůrky, jak je popsáno již v kapitole 3.4 (Přečišťování kultur).

Než byly trypanosomy smíchány s krví, byla kultura stočena v centrifuze na 10 minut, v 20 °C, při 4 100 rpm, aby mohlo být slito médium. Usazené buňky byly následně smíchány s 1 ml inaktivované krve.

Na sterilní krmítko se pomocí opálených pinzet nasadila kuřecí kůžička vnější stranou směrem vně. Kůžička byla upevněna a vypnuta na krmítku pomocí parafilmu. Po upevnění kůže byla do krmítka nanесena úzkou Pasteurovou pipetou připravená krev s trypanosomami. Takto připravené krmítko bylo upevněno ke stojanu a propojeno s hadičkami, jimiž proudila voda s teplotou 37 °C. Poté byla na krmítko pomocí gumičky uchycena síť s komáry/flebotomy. Podle potřeby bylo během sání rozsvíceno či zhasnuto. Samotné sání trvalo podle toho, jak komárům/flebotomům trvalo plné nasátí, proto se rozpětí času pohybovalo od 30 minut až do dvou hodin.

Po sání byla odebrána část zbylé krve z krmítka pomocí inzulinové stříkačky skrze membránu a pod mikroskopem byla kapka krve prohlédnuta, zda trypanosomy byly živé a došlo ke správnému odstranění komplementu v krvi.

#### 3.11.4. Uchovávání komárů a flebotomů po sání

Komáři/flebotomové byli po sání uchováváni v sítích v inkubátoru či v lednici v závislosti na určené pokusné teplotě a byl jim podáván cukerný roztok ve vatě. Na udržení vlhkosti byly sítě zabaleny v igelitových pytlích a vlhkost byla zajištěna navlhčenou vatou na Petriho misce. Po sání byli uchováváni s příslušnou teplotou v inkubátoru nebo v lednici.

V následujících tabulkách 3.17, 3.18, 3.19 a 3.20 jsou pro jednotlivé druhy hmyzu vypsány informace o provedených sáních, použitém izolátu, zvolené teplotě a počty opakování pokusů.

**Tabulka 3.17:** Membránové sání s *Culex pipiens quinquefasciatus*.

Izolát	Původ izolátu	Teplota	Počet pokusů
<b>CUL46</b> (CUL/CZ/ 2014/CUL46)	<i>Culiseta annulata</i>	8 – 11 °C	2
		15 °C	1
		8 – 11 °C → 15 °C	1
		21 °C	1
<b>CUL59</b> (CUL/CZ/2015/CUL59)	<i>Culiseta annulata</i>	21 °C	1
		15 °C	1

**Tabulka 3.18:** Membránové sání s *Culex pipiens molestus*.

Izolát	Původ izolátu	Teplota	Počet pokusů
<b>CUL46</b>	<i>Culiseta annulata</i>	8 – 11 °C	2
		15 °C	1
		8 – 11 °C → 15 °C	1
		21 °C	1

**Tabulka 3.19:** Membránové sání s *Aedes aegypti*.

Izolát	Původ izolátu	Teplota	Počet pokusů
CUL46	<i>Culiseta annulata</i>	21 °C	2
CUL107 (AED/CZ/2018/CUL107)	<i>Aedes vexans</i>		1
CELA1 (MCER/CZ/2017/CELA1)	<i>Cervus elaphus</i>		2
TAB1 (HYB/CZ/2019/TAB1)	<i>Hybomitra ciureai</i>		2
MOV11 (MEL/CZ/2017/MOV11)	<i>Ovis aries</i>		1

**Tabulka 3.20:** Membránové sání s *Phlebotomus perniciosus*.

Izolát	Původ izolátu	Teplota (°C)	Počet pokusů
CUL46	<i>Culiseta annulata</i>	21	2

### 3.11.5. Pitva hmyzu po sání

Flebotomové byli pitváni od sedmého dne po sání. Komáři, kteří byli uchovávaní v 21 °C a 15 °C, byli pitváni po desátém dnu. Komáři z nižších teplot byli ze začátku pitváni také po desátém dnu, popřípadě později, kdy došlo u těchto komárů k defekaci. Postup pitvy a popis pozitivních střev komárů/flebotomů byl stejný jako je popsáno v kapitole 3.2.1. U některých vybraných pozitivních vzorků bylo střevo roztrhnuto, sklíčko bylo ponecháno vyschnout, fixováno methanolem a uchováno pro případné další probádání. Další pozitivní vybrané vzorky byly zpracovány pro elektronovou mikroskopii.

## 3.12. Experimentální infekce myši

Na infekce myši bylo použito 10 pozitivních střev se silnou infekcí. Myším BALB/c byla perorálně podána roztrhnutá střeva ve fyziologickém roztoku pomocí pipety. Myši byly následující tři týdny kontrolovány odběrem a kultivací krve, která byla odebírána z ocásku. Konec ocásku se nastříhnu a poté byly inzulinovou injekční stříkačkou s médiem odebírány kapky krve. Krev s médiem byla vstříknuta do PEN zkumavek s krevním agarem. Zkumavky byly uchovávané v inkubátoru s teplotou 23 °C a byly kontrolovány jednou týdně po následující tři týdny. Taktéž proběhla u každé myši xenodiagnostika pomocí komárů *Ae. aegypti*.

## 3.13. Xenodiagnostika

Ke xenodiagnostice byly použity samice komárů *Ae. aegypti*. Do malé sítky bylo vyfoukáno asi 30 samic, a několik hodin před samotným pokusem jim byl odebrán cukr. Infikovaná myš byla uspána pomocí anestezie a byla položena do sítě s komáry. Po asi

půl hodině, když se samice nasály, byla myš uložena zpátky do klece a samice komárů byly uloženy do inkubátoru s teplotou 21 °C.

Tento experiment proběhl pro obě experimentálně infikované myši. Každá myš měla svoji síť s komáry. Po deseti dnech od sání byly započaty pitvy, jak je popsáno v kapitole 3.2.1.

### **3.14. Prediureze u komárů**

Pro zkoumání prediureze byli využíváni komáři *Ae. aegypti*, protože měli pozitivní výsledky z membránového sání. Do sítě s komáry byla vložena uspaná myš BALB/c a ihned po nasátí na myši byli komáři po jednom vyfoukávání do připravených zkumavek, které měly na dně krycí sklíčko. Komáři zde byli ponecháni, dokud nebyly zahlédnuty kapky na sklíčkách. Několik sklíček bylo prohlédnuto ještě před zaschnutím pod mikroskopem, zbytek sklíček byl zafixován methanolem a obarven Giemsou. Tyto trvalé preparáty byly prohlíženy na mikroskopu a dle potřeby byly pořízeny fotografie.

### **3.15. Giemsa-Romanowski barvení**

Barveny byly preparáty z prediureze a pozitivní střeva ze sání. Nejdříve byly preparáty ponechány zaschnout při pokojové teplotě a následně byly nafiloxovány pomocí methanolu a opět se nechaly vyschnout. Barvení preparátů probíhalo po dobu 20 minut pomocí barviva Giemsa-Romanowski, naředěnou s vodou 1:20. Po obarvení byly preparáty omyty vodou a ponechány k vysušení.

### **3.16. Focení trypanosom ve světelném mikroskopu**

Vybrané obarvené preparáty byly ve světelném mikroskopu Olympus BX51 TF prohlíženy pod imerzí při zvětšení 1 000x. Zvolené buňky byly pomocí programu v počítači QuickPHOTO CAMERA 3.2 vyfotografovány a v aplikaci bylo přidáno zkalibrované měřítko.

### **3.17. Měření délky trypanosom z pořízených fotografií**

Měření buněk probíhalo pomocí programu ImageJ (Rasband 1997), ve kterém bylo nejdříve zkalibrováno měření s měřítkem na fotografii. Poté byla pomocí funkce Segmented Line měřena délka buňky. Výsledky měření byly zapisovány do Excelu.

### 3.18. Skenovací elektronový mikroskop

U pozitivních nálezů při pitvách po sání byla vybraná střeva připravena pro skenovací elektronový mikroskop. Pozitivní střeva *Ae. aegypti* a *P. perniciosus* byla roztržena pomocí inzulinových stříkaček a následně přenesena do fixačního roztoku 2,5% glutaraldehydu, kde byla ponechána minimálně jeden den v chladu. U střev z komárů byla střeva fixována v 1,5 ml zkumavkách. Z důvodů malé velikosti a obtížné manipulace byla střeva flebotomů fixována na krycím skle. Další kroky zpracování zajišťovala Laboratoř elektronové mikroskopie PřF UK. Vzorky byly vypírány v 0,1 M pufru a následně odvodňovány ethanolovou nebo acetonovou řadou po 15 min. V posledním kroku přípravy byly vzorky přeneseny do amylacetátu a vysušeny pomocí kritického bodu CO<sub>2</sub>. Vysušená střeva či sklíčka se střevy byla nanесena na terčíky, které byly se vzorky pozlaceny. Takto připravené preparáty byly prohlíženy a foceny na elektronovém mikroskopu (JEOL 6380 LV).

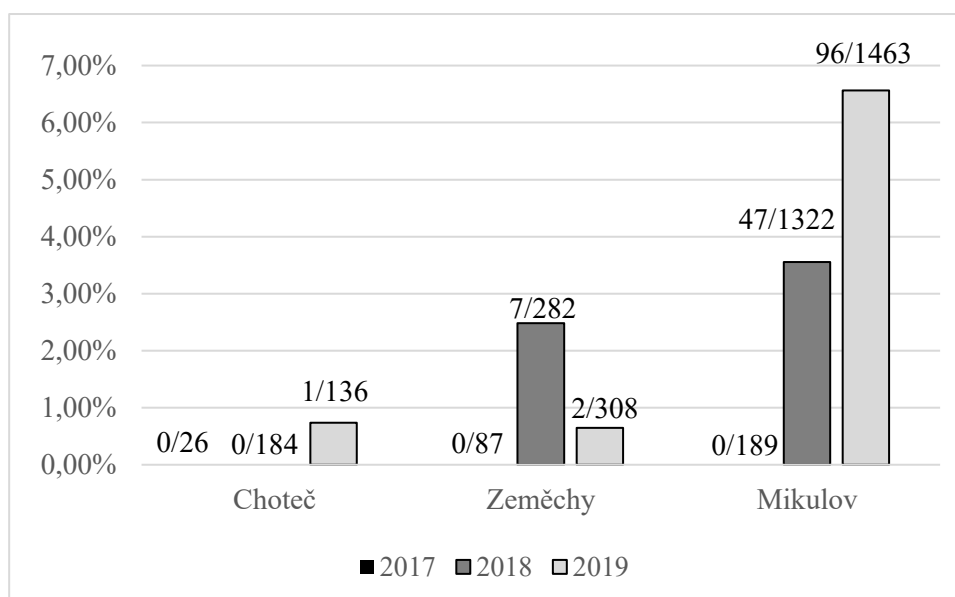
## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Detekce *T. theileri* u komárů

Celkem bylo v letech 2017 – 2019 odchyceno 4 027 komárů 18 druhů. Pouze PCR detekcí bylo zpracováno 3 258 jedinců, kteří byli rozděleni a zpracováni v 560 poolech. Při pitvách bylo vyšetřeno celkem 769 komárů. Počty odchycených a testovaných komárů jsou shrnuty v tabulce 4.1.

V roce 2017 nebyla *T. theileri* detekována na žádné z lokalit. Na lokalitě Choteč byla *T. theileri* detekována pouze v roce 2019, a to jen v jednom testovaném vzorku. Ve vzorcích ze Zeměch a Mikulova byly savčí trypanosomy nalezeny v letech 2018 a 2019. Hodnota MIR *T. theileri* v komárech fluktovala celkově od 0,7 % na lokalitě Zeměchy až po 6,4 % v Mikulově (obrázek 4.1).

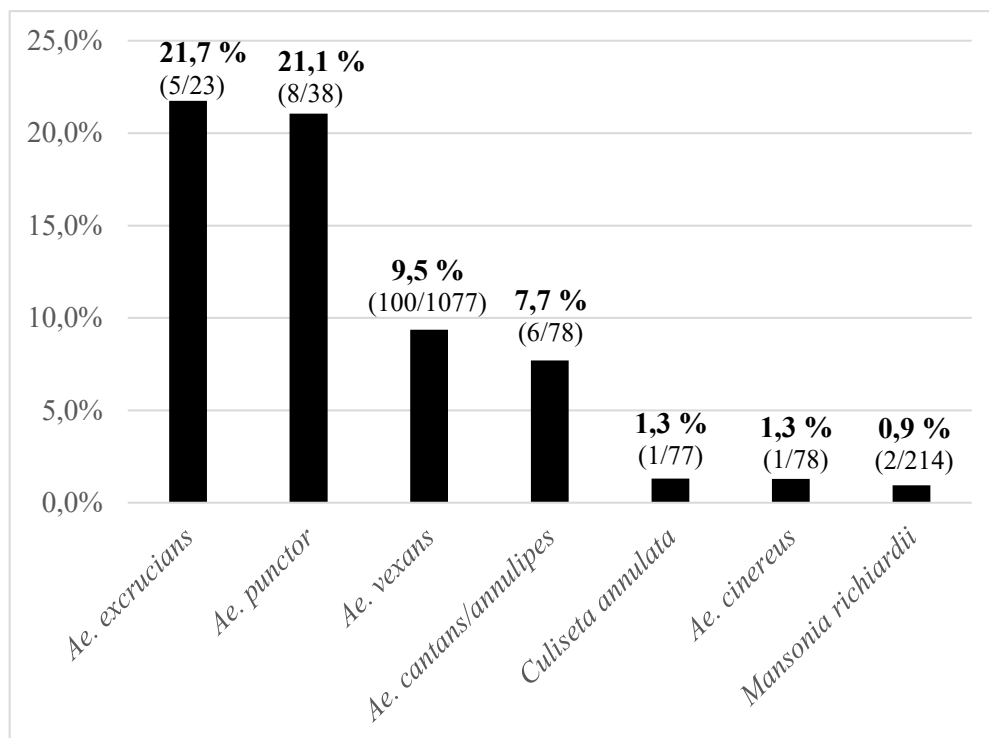
*Trypanosoma theileri* byla detekována celkem u 14 druhů z pěti rodů. Nejvyšší hodnota MIR byla zaznamenána u *Ae. punctor* 34,8 % v roce 2019 v Mikulově, nejnižší byla u *Cx. pipiens* 0,2 % taktéž v roce 2019 v Mikulově (MIR počítané pro alespoň minimální počet 15 vyšetřovaných komárů). Negativní výsledek detekce byl zaznamenán celkem u 4 druhů (*Ae. caspius*, *Ae. flavescens*, *Cx. molestus* a *Cul. morsitans*). Počty pozitivních vzorků jsou shrnuty v tabulce 4.1, na obrázku 4.2 je graf s hodnotami MIR pro jednotlivé pozitivní druhy za všechny sezóny.



**Obrázek 4.1:** Graf hodnot MIR *T. theileri* v komárech pro jednotlivé lokality a sezóny.

**Tabulka 4.1:** Počty odchycených druhů komárů a počty pozitivních poolů na daných lokalitách a letech. CH – Choteč, Z – Zeměchy, M – Mikulov, a/b/c – počet pozitivních vzorků daného druhu (pooly + pitvy) / celkový počet testovaných vzorků (pooly + pitvy) / celkový počet testovaných komárů daného druhu. Pozitivní detekce *T. theileri* jsou tučně. *Ae. sp.* a *Cx. sp.* jsou blíže neurčení komáři z důvodu nedostatku determinačních znaků.

Rok	2017			2018			2019		
Druh/lokalita	CH	Z	M	CH	Z	M	CH	Z	M
<i>Aedes annulipes</i>						1/1/3		0/1/2	2/7/7
<i>Ae. cantans</i>			0/2/2					0/1/3	4/14/14
<i>Ae. cantans/annulipes</i>		0/3/15			2/6/44				
<i>Ae. caspius</i>						0/4/18			0/6/22
<i>Ae. cataphylla</i>						1/2/2			
<i>Ae. cinereus</i>		0/4/15			1/7/52			0/2/10	0/1/1
<i>Ae. excrucians</i>		0/1/1			1/2/12			1/1/3	3/7/7
<i>Ae. flavescens</i>								0/1/4	
<i>Ae. punctor</i>		0/1/1	0/4/4	0/1/1	0/1/1	0/3/3	0/1/2	0/1/3	8/20/23
<i>Ae. sticticus</i>	0/1/1					1/1/1			
<i>Ae. vexans</i>	0/2/3	0/2/5	0/8/27		1/4/6	29/72/238	1/4/26	0/9/76	68/314/698
<i>Ae. sp.</i>	0/3/12	0/2/4	2/9/10	0/3/4	2/7/36	9/28/58	0/3/4	1/3/15	9/21/81
<i>Anopheles claviger</i>		0/1/1			0/2/3				1/1/2
<i>An. maculipennis</i>				0/1/1		1/7/12			0/2/3
<i>An. plumbeus</i>			0/1/1			2/8/9			0/3/3
<i>Culex modestus</i>		0/1/1			0/1/1	0/2/4		0/1/1	0/1/1
<i>Cx. pipiens</i>	0/1/10	0/4/31	0/11/39	0/20/177	0/13/108	0/280/871	0/12/103	0/22/191	1/231/598
<i>Cx. sp.</i>					0/1/1		0/1/1		0/2/2
<i>Culiseta annulata</i>			0/10/32	0/1/1		1/16/22			0/20/23
<i>Cul. morsitans</i>						0/1/2			
<i>Mansonia richiardii</i>		0/3/13	0/12/74		0/3/18	2/18/79			0/6/30



**Obrázek 4.2:** Graf hodnot MIR *T. theileri* v komárech u jednotlivých druhů celkově za všechny sezóny. Počítáno pro komáry s minimálním počtem 15 vyšetřovaných jedinců.

#### 4.2. Detekce *T. theileri* u ovádů

V Milovickém lese bylo celkem odchyceno 25 ovádů čtyř druhů. Podle četnosti zastoupení se jednalo o tyto druhy: *Hybomitra ciureai*, *Tabanus bromius*, *Haematopota pluvialis* a *Atylotus leowianus*. Celkem bylo při pitvách a PCR detekci kinetoplastid pozitivních 15 ovádů druhů *Hy. ciureai* a *T. bromius*. Pomocí sekvenace byla potvrzena přítomnost *T. theileri* u obou těchto druhů, celkově u jedenácti jedinců. Ostatní vzorky pozitivní na přítomnost kinetoplastid se nepodařilo dobře osekvenovat. V tabulce 4.2 jsou shrnuty výsledky u jednotlivých druhů ovádů a vypočítaná prevalence *T. theileri*.

**Tabulka 4.2:** Počty odchycených druhů ovádů a výsledky detekce *T. theileri*.

Kinetoplastida +: počet pozitivních pro kinetoplastida při pitvě a PCR, Tth +: počet *T. theileri* potvrzených sekvenací, prevalence Tth: vypočítaná prevalence pro *T. theileri*.

Druh	Počet	Kinetoplastida +	Tth +	Prevalence Tth
<i>Hybomitra ciureai</i>	16	11	8	50,0 %
<i>Tabanus bromius</i>	6	4	3	-
<i>Haematopota pluvialis</i>	2	0	0	-
<i>Atylotus leowianus</i>	1	0	0	-
<b>celkem</b>	<b>25</b>	<b>15</b>	<b>11</b>	<b>44,0 %</b>



#### 4.3. Detekce *T. theileri* u klošů rodu *Lipoptena*

Kloši byli získáni ze 13 lokalit a tří druhů zvířat: daňka evropského, srnce obecného a jelena evropského. Z jelenovité zvěře bylo získáno celkem 22 jedinců *Lipoptena cervi*, 225 jedinců *L. fortisetosa* a dva blíže neurčení jedinci *Lipoptena* sp. Počty klošů získaných z jednotlivých lokalit a zvířat jsou shrnuty v tabulce 4.3. Je zde vynechána lokalita České Budějovice, ze kterých byl získán pouze jeden negativní kloš a nebyl uveden hostitel, ze kterého byl získán.

Živí kloši byli vypitváni, u mrtvých jedinců byly trypanosomy detekovány pomocí PCR. Negativní výsledky na přítomnost *T. theileri* přinesly pitvy (n = 11) i PCR detekce (n = 11) u *L. cervi*. Taktéž výsledky pitev u *L. fortisetosa* (n = 18) byly negativní. Jedna *Lipoptena* sp. byla pitvána a u druhé byla provedena detekce pomocí PCR, oba tito kloši byli negativní. Pozitivní nálezy *T. theileri* byly zaznamenány pomocí PCR u *L. fortisetosa*. Hodnota MIR *T. theileri* (pitvy + PCR) v *L. fortisetosa* je 4,0 % (3/76), kdy někteří jedinci byli zpracovávaní v poolech. Pozitivní kloši pocházeli ze tří zvířat, dvou laní z Milovického lesa u Mikulova a jednoho srnce z Bystřice.

**Tabulka 4.3:** Počty získaných klošů z jednotlivých lokalit a hostitelů.

Tučně jsou pozitivní nálezy. *Lc* – *Lipoptena cervi*, *Lf* – *Lipoptena fortisetosa*, *L. sp.* – *Lipoptena* sp., a/b/c – počet pozitivních vzorků daného druhu (pitva + pooly) / počet zpracovaných vzorků (pitvy + pooly) / celkový počet v testovaných klošů daného druhu.

Obec/druh	Daněk evropský			Srnc obecný		Jelen evropský		
	<i>Lc</i>	<i>Lf</i>	<i>L. sp.</i>	<i>Lc</i>	<i>Lf</i>	<i>Lc</i>	<i>Lf</i>	<i>L. sp.</i>
Boršov nad Vltavou	0/2/2	0/1/5			0/5/25			
<b>Mikulov</b>		0/1/1					<b>2/12/12</b>	0/1/1
Blíževedly				0/4/4	0/4/5			
Hvězda					0/3/3			
Skalka				0/1/1	0/3/7			
Litice	0/2/2	0/4/4						
Planá					0/6/27			
<b>Bystřice</b>				0/4/4	<b>1/24/110</b>			
Neveklov				0/1/3	0/7/23			
Nové Strašecí						1/1/2		
Obecnice	0/3/3	0/2/2	0/1/1					
Vonoklasy				0/1/1				

#### 4.4. Detekce *T. melophagium* u klošů *Melophagus ovinus*

Pomocí PCR bylo vyšetřeno 82 a pitvou 99 klošů, celkem 181 jedinců. Pozitivní výsledky byly zaznamenány pouze při PCR detekci u vzorků z jedné lokality, kde bylo testováno celkem 79 jedinců. Kloši z této lokality byli zpracováni po jednotlivcích i v poolech. Celkem 53 vzorků ze 79 bylo pozitivních, 68,1 %. Výsledná prevalence 16,7 % byla počítána na lokality, aby se předešlo replikaci, pokud kloši pocházeli ze stejné ovce či stáda. V tabulce 4.4 jsou vypsány počty odchycených klošů na jednotlivých lokalitách.

**Tabulka 4.4:** Počty klošů ovčích získaných z jednotlivých lokalit. Tučně zvýrazněná je pozitivní lokalita.

Obec	Počet + / počet získaných
Vlkov	0/1
Ratíškovice	0/2
<b>Hořice</b>	<b>53/79</b>
Statenice	0/85
Přerov Předmostí	0/13
Valašská Senice	0/1
Prevalence na lokality	1 / 6 (16,7 %)

#### 4.5. Infekční sání

##### 4.5.1. Výsledky sání s *Culex pipiens quinquefasciatus* a *Cx. p. molestus* s uchováváním v různých teplotách

Výsledky experimentálního sání s následným uchováváním komárů v různých teplotách jsou rozepsány v tabulce 4.5. U obou izolátů pocházejících z *Cul. annulata* CUL59 a CUL46 s komáry uchovávanými při teplotách 21 °C byli všichni pitvaní komáři negativní. U jedinců z 15 °C se vyskytly slabé až středně silné infekce jen u několika jedinců. U *Cx. p. quinquefasciatus* (dále jen *CQ*) byly ve dvou střevech přítomny zbytky krve, v jednom případě se středně silnou infekcí a v druhém se slabou infekcí obsahující pouze 3 buňky parazitů. U *Cx. p. molestus* (dále jen *CM*) byly detekovány tři středně silné infekce s rozetami v zadní části střeva u rektálních ampulí.

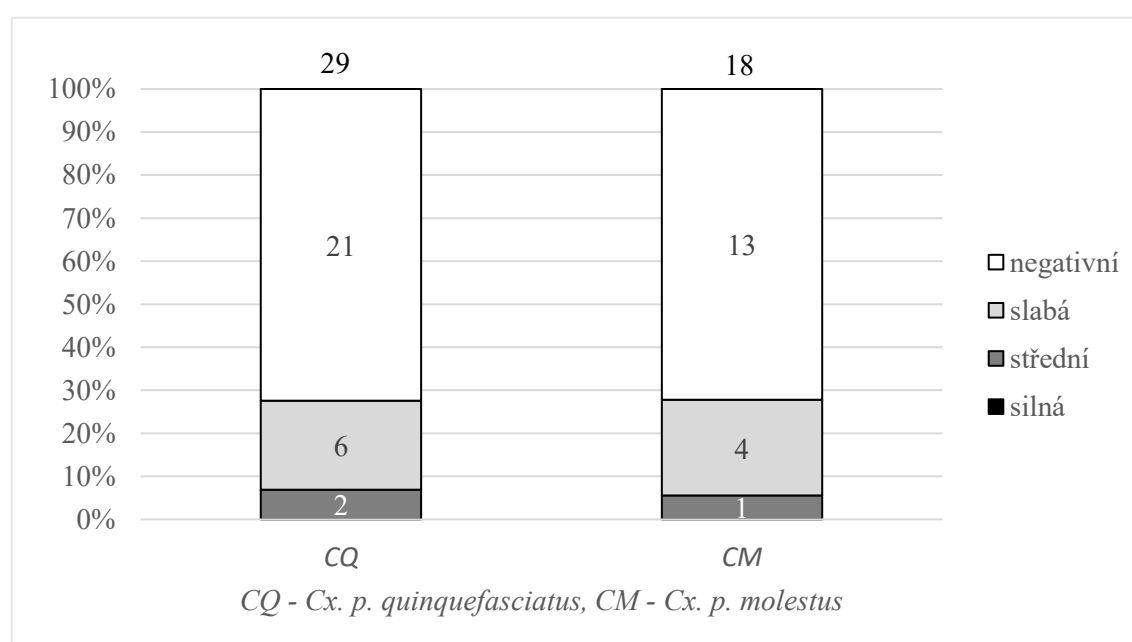
Při změně teplot, kdy byli komáři uchovávaní nejdříve v teplotě 8 – 11 °C a později v 15 °C, byl detekován pouze jeden pozitivní komár *CQ* se slabou infekcí ve střední části střeva.

U komárů přechovávaných v lednici bylo trávení natolik zpomaleno, že po 20. dni od sání byla ve střevě stále u některých přítomná krev. Tito komáři nejsou zahrnuti mezi

pozitivní (tabulka 4.5). U komárů *CQ* byly detekovány dvě středně silné infekce a čtyři slabé infekce. U *CM* nebyla taktéž zaznamenána silná infekce a celkem bylo pozitivních pět komárů, jeden se střední infekcí a ostatní se slabou infekcí. V některých případech se jednalo o velmi slabé infekce s počtem parazitů do deseti buněk. Některé infekce nesly pouze volné bičíkovce ve střevě, ale u některých byli pozorováni paraziti uchycení ke stěně střeva. Lokalizace slabých infekcí byla vždy v mesenteronu, zatímco u středně silných infekcí se trypanosomy vyskytovaly v různých částech zadního střeva a v jednom případě byli bičíkovci ve středním střevě (obrázek 4.3).

**Tabulka 4.5:** Počty pozitivních komárů u *Cx. p. quinquefasciatus* (*CQ*) a *Cx. p. molestus* (*CM*) s ohledem na používané teploty při uchovávání komárů po sání.

Izoláty	Teplota (°C)	Druh	Počet + / celkem pitvaných
CUL59	15	<i>CQ</i>	2/15
	21	<i>CQ</i>	0/33
CUL46	8 – 11	<i>CQ</i>	8/29
		<i>CM</i>	5/18
	8 – 11 → 15	<i>CQ</i>	1/14
		<i>CM</i>	0/6
	15	<i>CQ</i>	0/54
		<i>CM</i>	3/18
	21	<i>CM</i>	0/32
		<i>CQ</i>	0/30

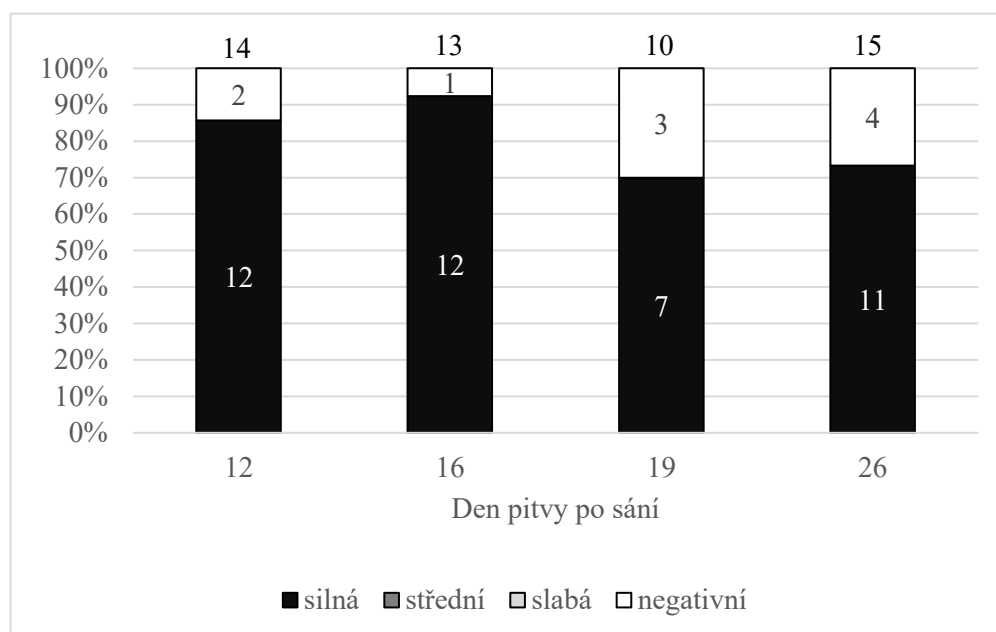


**Obrázek 4.3:** Graf shrnující výsledky sání s oběma druhy komárů a izolátem CUL46 s uchováváním při teplotě 8 – 11°C.

#### 4.5.2. Výsledky sání s *Aedes aegypti* s uchováváním při teplotě 21 °C

##### Izolát z *Aedes vexans*, CUL107

U tohoto experimentu byly detekovány pozitivní infekce. Celkem bylo vypitváno 52 komárů, z nichž 42 neslo silnou infekci. Silné infekce byly detekovány po celou dobu pitev od 12. až do 26. dne po sání (obrázek 4.4). Prevalence při tomto experimentu dosahovala 80,8 %. Ve střevě nepohyblivé trypanosomy tvořily rozetovité útvary, které byly uchycené ke stěně střeva, a to v oblasti rektálních ampulí. V některých případech byla infekce rozšířena i mimo tuto část a vyplňovala i zadní střevo.



**Obrázek 4.4:** Výsledky experimentálního sání s izolátem z *Aedes vexans*, CUL107.

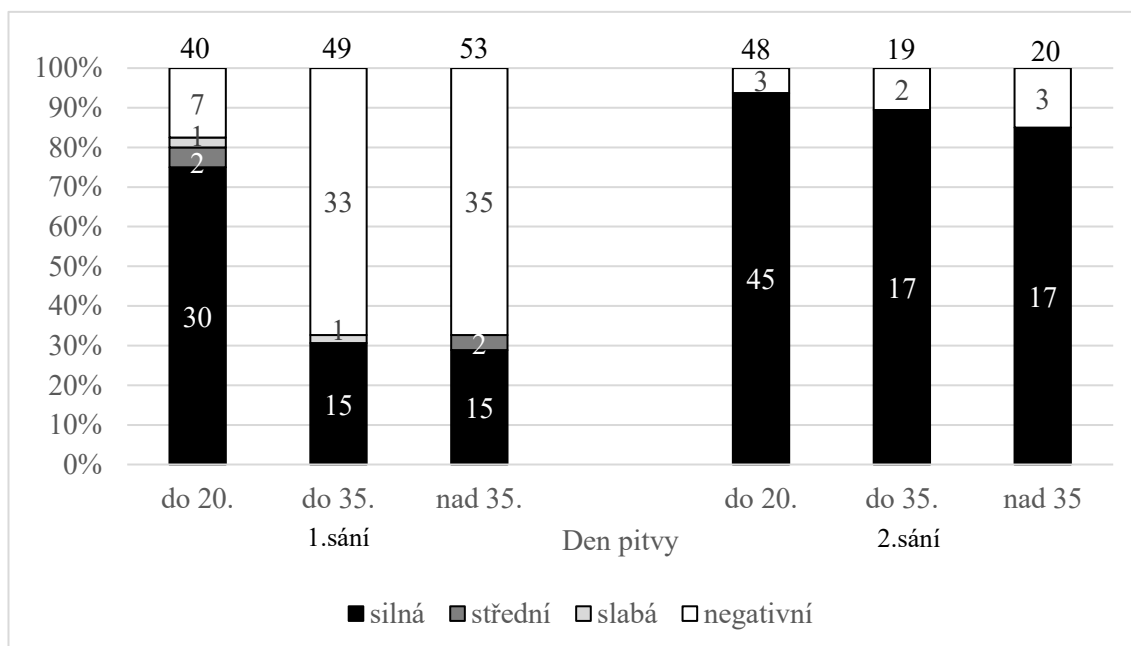
##### Izolát z *Culiseta annulata*, CUL46

Sání s tímto izolátem přineslo pozitivní výsledky. Zatímco v prvním experimentu počet infikovaných komárů klesal v čase a obsahoval i středně silné a slabé infekce, tak druhý experiment přinesl pouze silné infekce s velkým počtem pozitivních komárů po celou dobu pitev (obrázek 4.5).

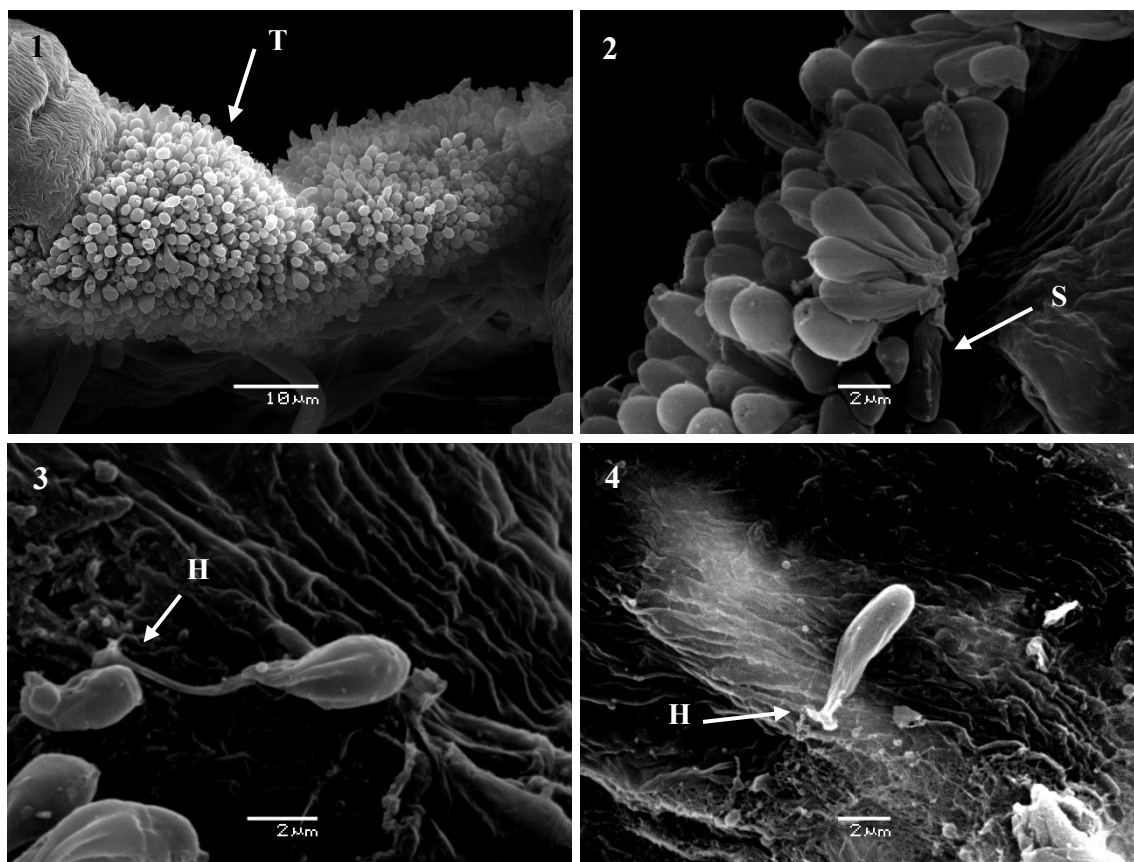
V prvním sání bylo pozitivních celkem 66 ze 140 vypitvaných komárů s prevalencí 47,1 %. U druhého experimentu z vyšetřených 87 komárů bylo pozitivních 79 jedinců. Prevalence u tohoto sání dosáhla 90,8 %.

Infekce byly lokalizované v zadním střevě v místě rektálních ampulí. V některých komárech byla infekce rozšířena i v jiné části zadního střeva. Trypanosomy tvořily uchycené rozetové útvary ke stěně střeva. U uvolněných bičíkovců nebyl ve světelném mikroskopu pozorován bičík, trypanosomy byly drobné s kulatým či vejčitým tvarem a málo pohyblivé. Vybraná pozitivní střeva komárů byla pozorována ve skenovacím

elektronovém mikroskopu, na kterém bylo možné pozorovat silné infekce trypanosom uchycené ke stěně střeva pomocí hemidesmosomu (obrázek 4.6).



**Obrázek 4.5:** Graf s počty vypitvaných komárů, znázorňující míry infekce v čase pitev.



**Obrázek 4.6:** Fotografie ze skenovacího elektronového mikroskopu (autor AB). T – trypanosomy v roztrženém střevě, S – střevo, H – hemidesmosom.

### **Izolát z *Hybomitra ciureai*, TAB1**

V prvním pokusu se nasálo pouze 14 komárů. Všichni tito komáři byli při pitvách negativní na přítomnost trypanosom.

U druhého pokusu byli pozitivní čtyři komáři z 51 vypitvaných, tj. prevalence 7,8 %. Jednalo se o dvě slabé a dvě středně silné infekce. Ve třech případech byly buňky volně ve střevě, ale u jedné středně silné infekce byly pozorovány malé rozety s pohyblivými buňkami. Trypanosomy se vyskytovaly především v zadní části střeva u rektálních ampulí.

### **Izolát z *Melophagus ovinus*, MOVII**

Toto sání proběhlo pouze jednou, celkem bylo vypitváno 36 komárů, z nichž ani jeden nebyl infikovaný.

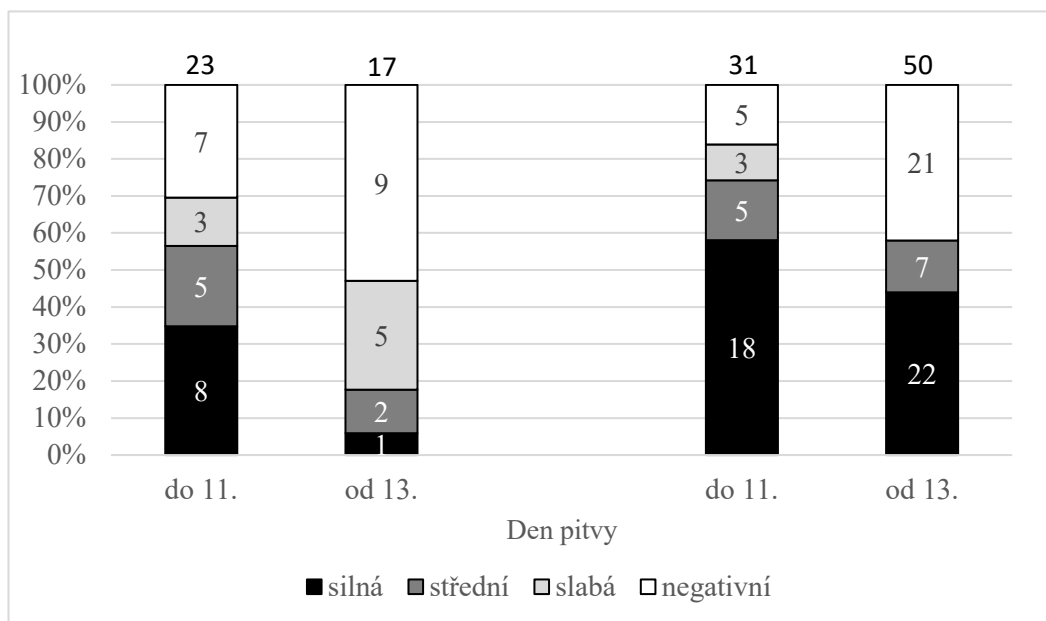
### **Izolát z *Cervus elaphus*, CELA1**

Membránové sání s izolátem z jelena proběhlo dvakrát a vždy přineslo negativní výsledky. Při prvních pitvách bylo vyšetřeno 50 komárů, u druhého pokusu 38.

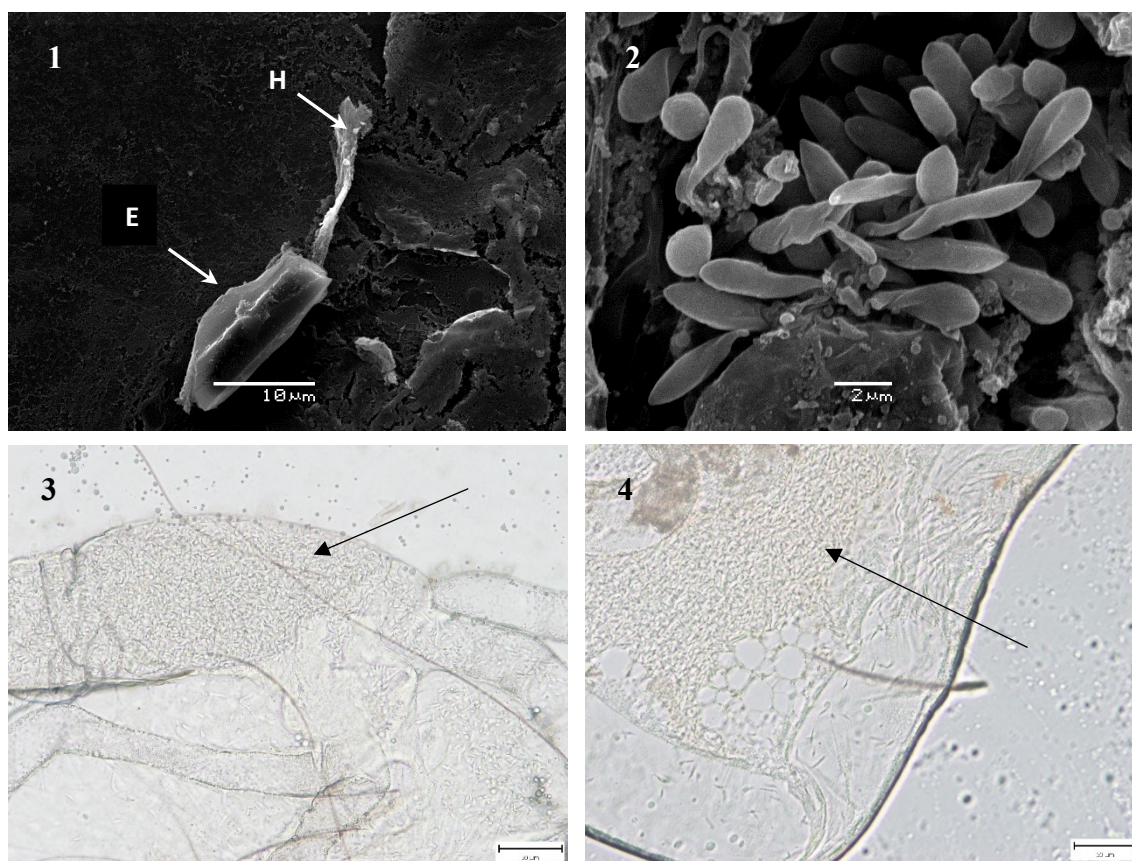
### **4.5.3. Výsledky sání s *Phlebotomus perniciosus***

Sání probíhalo s izolátem CUL46 z *Culiseta annulata*. Zatímco při prvním experimentu bylo v průběhu pitev přibližně stejné zastoupení silných, středních a slabých infekcí, tak při druhém sání převažovaly silné infekce (obrázek 4.7). U prvního sání s flebotomy byla prevalence 60,0 % a u druhého 67,9 %.

U slabých infekcí byly pozorovány volné buňky v různých částech střeva. U silných a středních infekcí tvořily trypanosomy rozety uchycené ke stěně střeva v zadním střevě. V některých případech byla infekce lokalizována pouze na oblast rekta. Během pitev při roztržení střeva byly u některých jedinců pozorovány dva typy buněk, pohyblivější epimastigoti nebo menší kulatější buňky, které byly méně pohyblivé až nepohyblivé. Část pozitivních střev byla využita k elektronové mikroskopii, kde bylo možné sledovat epimastigoty uchycené ke stěně střeva pomocí hemidesmosomu (obrázek 4.8).



**Obrázek 4.7:** Graf ukazující výsledky sání s *Phlebotomus perniciosus* a izolátem Cul46.



**Obrázek 4.8:** 1 – 2: epimastigoti ve střevě, E – epimastigot, H – hemidesmosom, fotografie ze skenovacího elektronového mikroskopu (autor AB), 3 – 4: trypanosomy ve střevě označené šipkami, fotografie ze světelného mikroskopu, měřítko 10  $\mu\text{m}$  (autor MS).

## 4.6. Infekce laboratorních myší

Na infekci myší bylo použito vždy 10 pozitivních střev z *Ae. aegypti* a *P. perniciosus* nakaženými izolátem CUL46 pocházející z *Culiseta annulata*. Obě myši měly všechny kontroly pomocí kultivace negativní. Stejně výsledky přinesla i xenodiagnostika, kdy bylo vypitváno přes 30 komárů nasátých na každé myši.

## 4.7. Morfologie trypanosom u komára a ováda

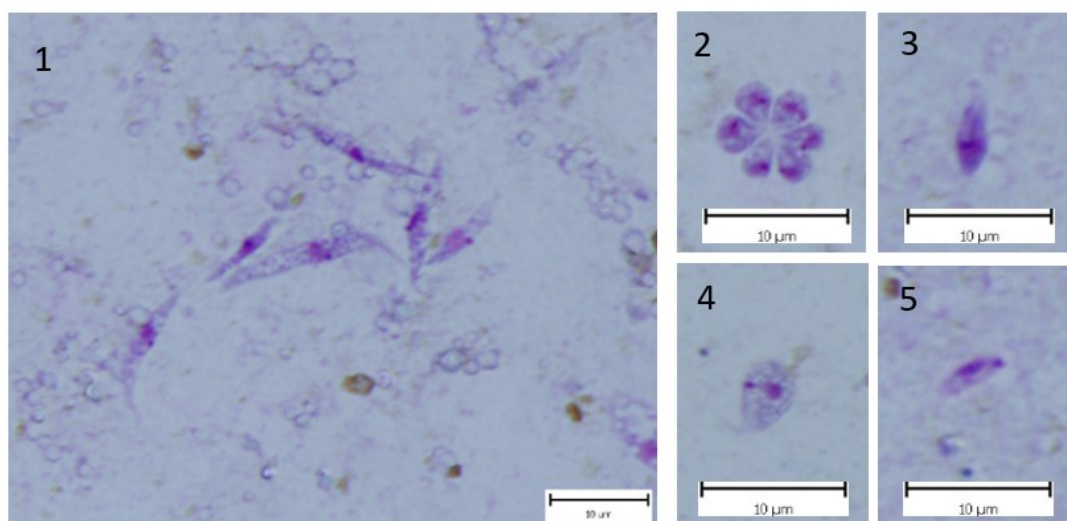
Při mikroskopii střeva ovádů byli nalezeni podlouhlí a kapkovití epimastigoti s délkami od 10,06  $\mu\text{m}$  do 25,39  $\mu\text{m}$ , ne vždy byl zřetelný bičík. Kromě epimastigotů byli pozorováni i metacykličtí trypomastigoti/amastigot-like trypanosomy, kteří dosahovali délek od 3,40  $\mu\text{m}$  do 7,79  $\mu\text{m}$ , průměrná hodnota byla 4,66  $\mu\text{m}$ . U těchto buněk byl kinetoplast lokalizován buď uprostřed buňky vedle jádra, nebo terminálně na konci buňky. U tohoto typu buněk nebyl pozorován volný bičík (tabulka 4.6).

Pro analýzu buněk trypanosom u komárů byla využita střeva ze sání *Aedes aegypti* a s izolátem CUL46. Identifikováni byli epimastigoti s délkami od 10,20  $\mu\text{m}$  do 23,48  $\mu\text{m}$  s ne vždy zřetelným bičíkem. Dále byly pozorovány trypomastigot/amastigot-like trypanosomy s kinetoplastem lokalizovaným u jádra uprostřed buňky nebo terminálně na samém konci buňky (obrázek 4.9). Bičík u těchto buněk nebyl pozorován. Některé trypomastigot/amastigot-like buňky byly pozorovány v rozetách, všichni tito bičíkovci měli kinetoplast umístěný uprostřed buňky v blízkosti jádra. Délka trypanosom s kinetoplastem uprostřed buňky byla od 3,29  $\mu\text{m}$  do 9,63  $\mu\text{m}$  s průměrnou hodnotou 5,10  $\mu\text{m}$ . Buňky s kinetoplastem terminálně měřily od 3,30  $\mu\text{m}$  do 6,80  $\mu\text{m}$  s průměrem 4,96  $\mu\text{m}$ . Dalším pozorovaným typem buněk byli dva sféromastigoti s délkami 6,91  $\mu\text{m}$  a 9,92  $\mu\text{m}$  (tabulka 4.6 a obrázek 4.9).



**Tabulka 4.6.:** Shrnující tabulka zjištěných morfologických parametrů.

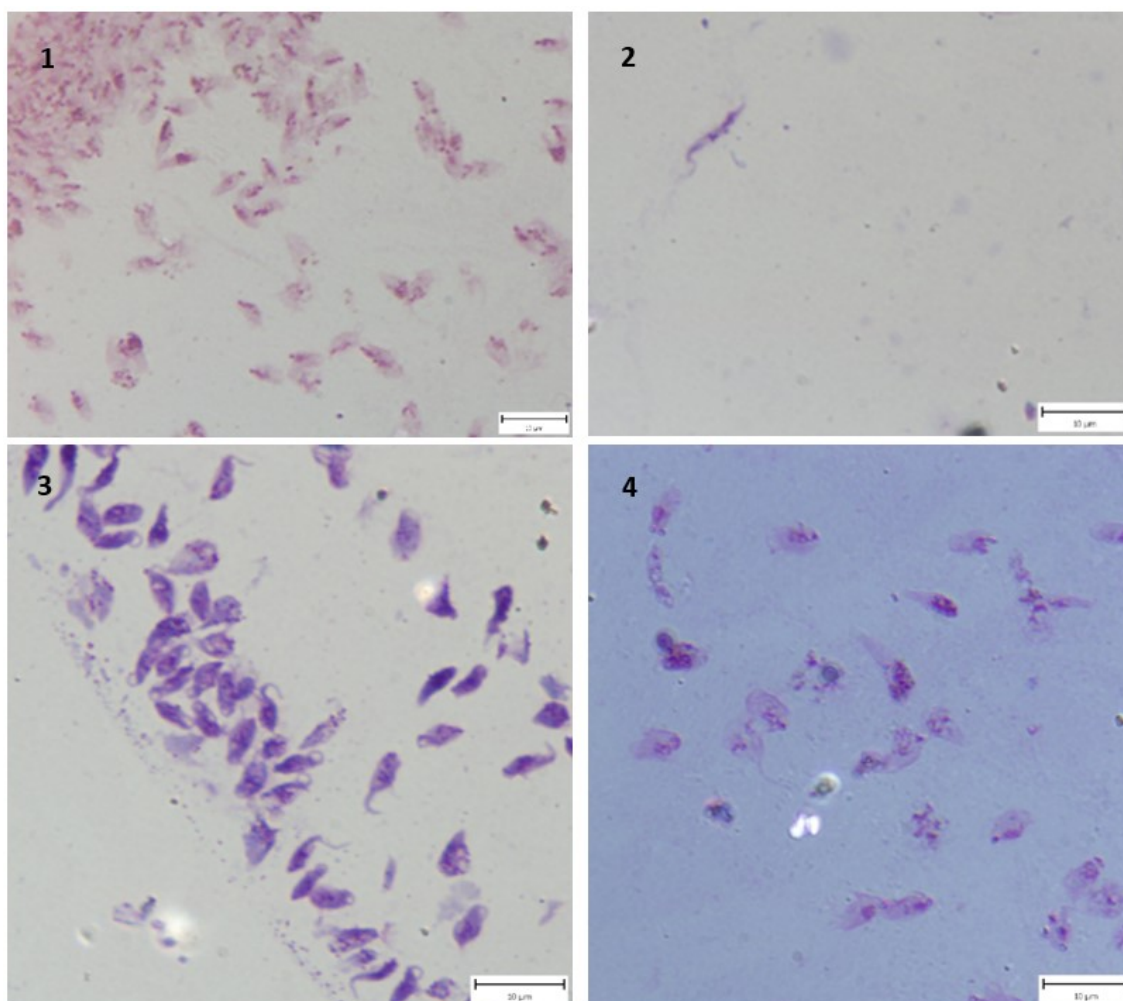
Druh	Forma	Délka (μm)	Volný bičík	Pozorovaná rozeta
<b>Komár</b>	epimastigot	10,20 – 23,48	ano/ne	ne
	sféromastigot	6,91 – 9,92	ano	ne
	metacyklický trypomastigot kDNA uprostřed	3,29 – 9,63	ne	ano
	metacyklický trypomastigot kDNA terminálně	3,30 – 6,80	ne	ne
<b>Ovád</b>	epimastigot	10,06 – 25,39	ano/ne	ne
	metacyklický trypomastigot kDNA uprostřed	4,99 – 8,15	ne	ne
	metacyklický trypomastigot kDNA terminálně	3,40 – 7,79	ne	ne



**Obrázek 4.9:** Měřítka 10 μm. **1** – epimastigoti, **2** – rozeta, **3** – trypomastigot/amastigot-like s kinetoplastem vedle jádra, **4** – sféromastigot, **5** – trypomastigot/amastigot-like s kinetoplastem terminálně (autor AB).

#### 4.8. Prediureze u infikovaných komárů

Na sklíčkách obarvených Giemsou byla pozorována vývojová stadia trypanosom *T. theileri*. Z 18 vyšetřovaných byly trypanosomy pozorovány na šesti sklíčkách. Na obarvených preparátech byli pozorováni metacyklickí trypomastigoti neboli amastigot-like trypanosomy. Kromě těchto infekčních stádií byli v menší míře pozorováni epimastigoti a sféromastigoti (obrázek 4.10).



**Obrázek 4.10:** Měřítka 10 µm. **1:** Metacykličtí trypomastigoti. **2:** epimastigot, **3:** epimastigoti a metacykličtí trypomastigoti, **4:** sféromastigoti a metacykličtí trypomastigoti (autor AB).

#### 4.9. Vyšetřování krevních vzorků

Pomocí PCR bylo vyšetřeno 16 krevních vzorků z jelena evropského a jeden vzorek z daňka evropského. Všechny tyto vzorky byly negativní. U dvou vzorků z jelena evropského byla možná i kultivace, ale ani ta nepřinesla žádné pozitivní výsledky.

Izoláty z krevních vzorků použitých při membránovém sání a fylogenetické analýze byly získány v minulých letech v rámci našeho týmu.

#### 4.10. Fylogenetická analýza

Pro analýzu bylo využito celkem 169 vlastních sekvencí pocházejících z komárů, ovádů muchniček, jeleních a ovčích klošů a dva izoláty z jelenovité zvěře. Na obrázku 4.11 je fylogenetický strom vytvořený se získanými sekvencemi, které spadají do obou linií TthI a TthII. Velká část vlastních sekvencí tvoří samostatnou skupinu v rámci TthII, tato větev

však není podpořena bootstrapem (na obrázku v bílém rámečku vpravo). Tyto sekvence pocházejí z různých lokalit a obsahují zejména sekvence z komárů, ale i z jednoho kloše *Lipoptena fortisetosa*. Ostatní dva vzorky pocházející z jeleních klošů spadají, jak do linie TthI i TthII. Variabilita se také ukazuje u sekvencí pocházejících z ovádů či muchniček, které se také vyskytují v obou liniích.

Sekvence *Trypanosoma melophagium* získané z klošů ovčích tvoří společně větev se sekvencemi popsány z Chorvatska a Skotska. Odlišnou větev podpořenou bootstrapem 59 tvoří sekvence *T. melophagium* pocházející z Mexika.

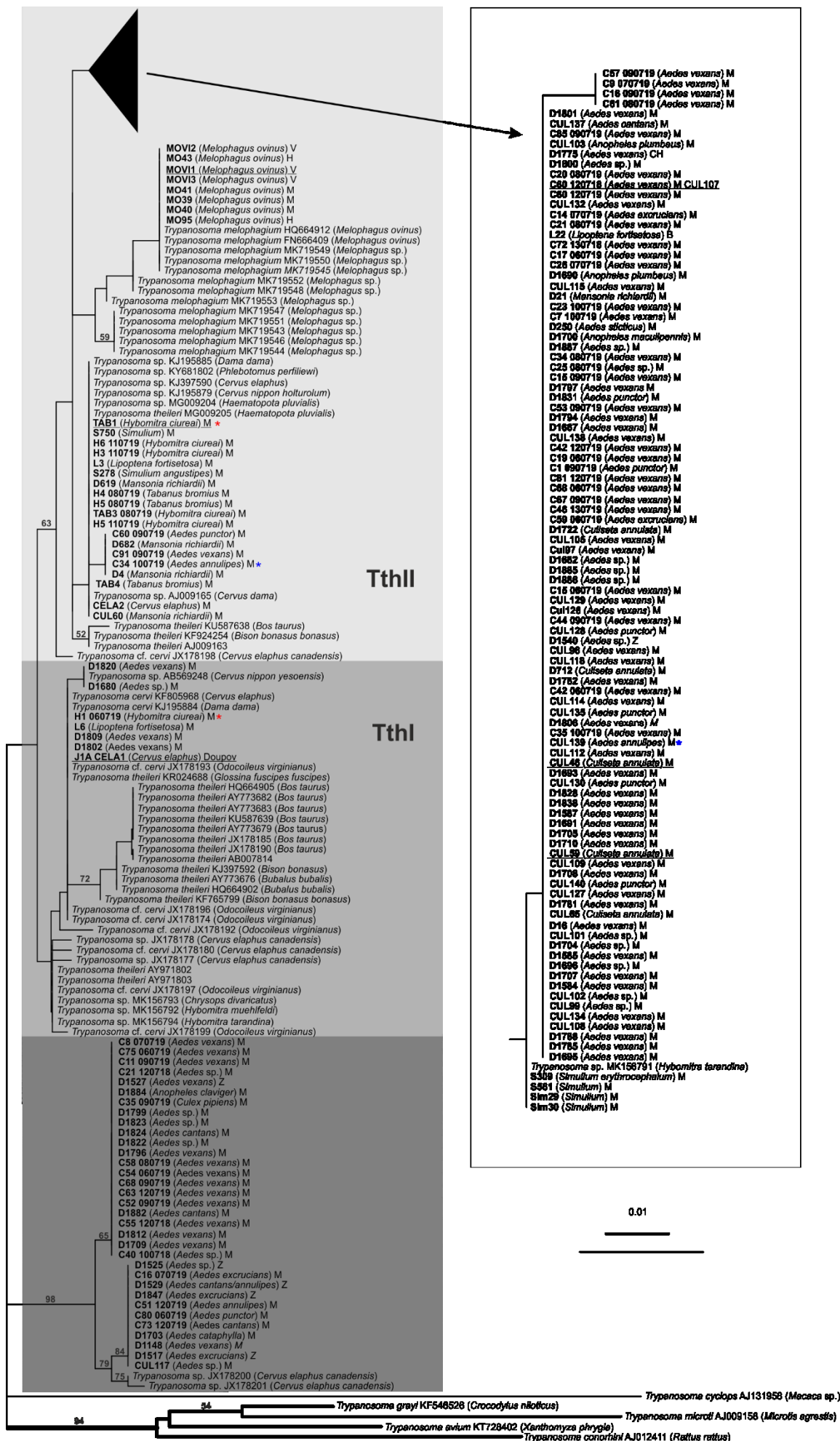
Do fylogenetického stromu byly zařazeny i dvě a dvě sekvence získané ze dvou smíšených infekcí, které byly detekovány pomocí PCR střeva a kultury z jednoho jedince. Odlišné sekvence získané z ováda *Hybomitra ciureai* jsou označené červenou hvězdičkou, modrou hvězdičkou pak sekvence s původem z *Aedes annulipes*.

Odlišnou skupinu podpořenou bootstrapem 98 tvoří sekvence získané z komárů (tmavě šedý obdélník). Tato skupina má jako nejpříbuznější sekvence pocházející z *Cervus elaphus canadensis* z USA. V rámci této skupiny naše izoláty tvoří dvě větve, kam spadají sekvence pocházející pouze z komárů, a to jak z lokality Mikulov, tak také Zeměchy.

Izoláty použité při experimentálním sání jsou v obrázku označené podtržením. Kultury z komárů CUL46, CUL59 a CUL107 spadají společně do jedné skupiny. Ovádí izolát TAB1 spadá společně s komářními kulturami do linie TthII, ale není zcela identická. Kultura MOV11, pocházející z kloše ovčího, leží na společné větvi *T. melophagium*. Izolát získaný z jelení krve CELA1 spadá jako jediný z použitých izolátů v membránovém sání do linie TthI.

**Obrázek 4.11:** Fylogenetický strom vytvořený na základě SSU rRNA.

Tučně zvýrazněné jsou vlastní sekvence. Světle šedý obdélník značí sekvence spadající do linie TthII, tmavě šedý obdélník linii TthI. Sekvence označené barevnou hvězdičkou pocházejí z jednoho jedince, ováda – červená/komára – modrá. Podtržení značí izoláty využívané při experimentálním sání. V závorkách za kódy sekvencí je napsaný hostitel. Písmena na konci značí lokalitu, M – Mikulov, CH – Choteč, Z – Zeměchy, B – Bystřice, V – Vlkov, H – Hořice.



## 5. DISKUSE

### 5.1. Detekce *T. theileri* v odchyceném hmyzu

#### 5.1.1. Komáři

Během této práce bylo vyšetřeno celkem 4 027 komárů, 18 druhů. Zatímco na lokalitách Zeměchy a Mikulov byla *T. theileri*-like detekována ve dvou ze tří testovaných sezon, na lokalitě Choteč byl pouze jeden pozitivní komár v jedné sezóně. Tyto výsledky mohou být ovlivněny nižším počtem vyšetřených komárů, ale také druhovým zastoupením na jednotlivých lokalitách. Na Chotči bylo celkově odchyceno více komárů rodu *Culex*, kteří jsou spíše ornithofilní (Rádrová et al. 2013), zatímco na lokalitě Zeměchy bylo odchyceno více druhů z rodu *Aedes*, kteří jsou oportunní nebo mammalofilní (Börstler et al. 2016; Schönenberger et al. 2016). Dalším hlediskem ovlivňujícím prevalenci byly odchvy probíhající v oboře Milovického lesa, kde je vysoký výskyt jelenovité zvěře, a tudíž i dostatek hostitelů pro cirkulaci nákazy.

Pozitivních komárů na *T. theileri*-like bylo 14 různých druhů. Nejvyšší prevalence byla u druhů *Ae. excrucians* (MIR = 21,7 %), *Ae. punctor* (21,1 %), *Ae. vexans* (9,5 %) a *Ae. cantans/annulipes* (7,7 %). Schoener et al. (2018) detekovali *T. theileri*-like v Rakousku u sedmi druhů, a to s nejvyšší hodnotou MIR u *Ae. gemiculatus* (MIR = 3,9 %) *An. plumbeus* (0,9 %) a *Ae. vexans* (0,8 %). Tyto prevalence jsou v porovnání s našimi výsledky nižší. To může být pravděpodobně ovlivněno lokalitou odchytu, kdy nejvyšší prevalence *T. theileri*-like byly zaznamenány u komárů odchycených v oboře Milovický les. Přestože prevalence u *Ae. vexans* nebyla nejvyšší, bylo nejvíce pozitivních jedinců detekováno právě u tohoto druhu (100/1077). Vysoký počet pozitivních jedinců naznačuje, že by mohl být *Ae. vexans* efektivním přenašečem. To také podporují naše popisy infekcí při pitvách v Mikulově, kdy ve střevě infikovaných komárů *Ae. vexans* byly pozorovány silné infekce s uchycenými trypanosomami ke stěně střeva.

Komáři rodu *Aedes* jsou oportunní nebo mammalofilní, tedy mají vyšší šanci se savčími trypanosomy nakazit než například komáři druhu *Cx. pipiens*, kteří jsou spíše ornithofilní (Rádrová et al. 2013; Börstler et al. 2016; Schönenberger et al. 2016). To odpovídá našim výsledkům, kdy *T. theileri*-like byla detekována převážně u komárů rodu *Aedes*. Během naší studie byl zaznamenán jeden pozitivní jedinec *Cx. pipiens* s infekcí *T. theileri*-like. Tato infekce byla zjištěna při pitvách, kdy byly trypanosomy lokalizovány v zadním střevě bez přítomnosti krve. Obdobný nález popisují i Schoener et al. (2018),

kterí pomocí PCR detekce zaznamenali *T. theileri*-like u *Cx. pipiens*. Tyto nálezy potvrzují závěry studie hostitelských preferencí *Cx. pipiens* (Rádrová et al. 2013), kdy ochota sát na savcích byla potvrzena jak použitím sentinelových pastí, tak sekvenováním nasáté krve (Rádrová et al. 2013). Naopak v Německu *Cx. pipiens* sál spíše na savcích (78 %) než na ptačích hostitelích (Börstler et al. 2016).

Schoener et al. (2018) detekovali ve své studii *T. theileri*-like také u *An. plumbeus* a *Mansonia richiardii*. V této práci byly savčí trypanosomy detekovány taktéž v těchto druzích, navíc byly nalezeny u *An. maculipennis*, *An. claviger* a *Cul. annulata*. Nicméně bylo odchyceno a vyšetřeno malé množství těchto komárů, proto nemohou být prevalence porovnány s ostatními nálezy.

### 5.1.2. Kloši

Kloši *Melophagus ovinus* byli získáni ze šesti různých lokalit, ale pouze na jedné z nich byla detekována *T. melophagium* (16,7 %). Prevalence u klošů na pozitivní lokalitě byla 68 %. Prevalence na pozitivní lokalitě byla vysoká, podobně jako ve studii ze Skotska (82,4 %), i Chorvatska, kde na všech pěti vyšetřovaných lokalitách byla prevalence pozitivních klošů od 50 % do 94,5 % (Gibson et al. 2010; Martinković et al. 2012). Tato vysoká prevalence může být i díky tomu, že ovčí kloši neopouštějí svého hostitele a často na něm sají (Small 2005), takže je-li ovce pozitivní, je vysoká pravděpodobnost, že z ní sebrání kloši budou infikováni (Martinković et al. 2012).

V České republice se vyskytují dva druhy jeleních klošů, *Lipoptena cervi* a *L. fortisetosa*. Vyšší množství získaných klošů bylo druhu *L. fortisetosa*, to potvrzuje běžný výskyt těchto klošů na studovaných lokalitách v pěti krajích (Ducháč a Bádr 1998). *T. theileri*-like byla detekována pouze u *L. fortietosa*, na rozdíl od klošů *L. cervi*, kde savčí trypanosomy nebyly zaznamenány, což může být zapříčiněno i malým počtem vyšetřených klošů tohoto druhu. Všechny pozitivní nálezy byly detekovány pomocí PCR a následné sekvenace. Během pitev nebyla žádná infekce zaznamenána, což je nejspíše ovlivněno malým počtem vypitvaných jedinců a nízkou prevalencí *T. theileri*-like v jeleních kloších. Protože detekce pomocí PCR neprokazují, zda dochází k vývoji trypanosom po nasátí vektorem a zda se nejedná pouze o záchyt nasátých trypanosom v krvi, nelze prokázat, zda by *L. fortisetosa* mohla hrát roli v přenosu. Böse a Petersen (1991) popisují u *L. cervi* při pitvách střeva rozety a epimastigoty, avšak nebyla popsána infekční stadia či provedeny infekční pokusy. Garcia et al. (2020) předpokládají *L. mazamae* jako možného přenašeče nově popsané *T. trinaperronei*, kterou detekovali

pomocí PCR, nicméně ani tady nelze soudit, jestli dochází k vývoji těchto trypanosom ve střevě a zda vznikají infekční stádia, které byla popsána u ovčích klošů nebo ovádů (Hoare 1972e; Molyneux 1975; Molyneux et al., 1978; Böse a Heister 1993).

Jelikož jelení kloši po nalezení hostitele odhazují křídla a hostitele už nemění, pravděpodobnost, že by tito kloši hráli hlavní roli v přenosu, je malá. Nicméně je zde možnost kontaktního přenosu klošů jako u *M. ovinus*, avšak ne v takové míře jako v ovčím stádě, kde jsou zvířata více v kontaktu mezi sebou (Small 2005). Dále by nákaza hostitelů mohla probíhat při allogroomingu, kdy dochází k vykousávání ektoparazitů u zvířat navzájem (Böhm et al. 2007).

Přestože naše výsledky zcela neobjasnily roli jeleních klošů v přenosu trypanosom *T. theileri*-like, lze u pozitivních nálezů předpokládat, že zvířata, ze kterých byli pozitivní kloši získáni, byla infikována těmito trypanosomami (Martinković et al. 2012). U pozitivních klošů z Mikulova se jednalo o laň jelena evropského a u kloše z Bystřice o srnce obecného.

### **5.1.3. Ovádi**

Ovádi byli potvrzeni jako přenašeči *T. theileri* jak pro populace vyskytující se u dobytka, tak pro trypanosomy u jelenovité zvěře (Böse et al. 1987). V této práci byly trypanosomy detekovány v družích *Hy. ciureai* a *T. bromius*. Trypanosomy podrodu *Megatrypanum* byly dříve detekovány u ovádů těchto dvou rodů, ale zatím nebyly zaznamenány přímo u druhu *Hy. ciureai* (Böse a Heister 1993; Ganyukova et al. 2018; Werszko et al. 2019; Votýpka et al. 2019). Celková prevalence z vyšetřovaných ovádů byla 44 % pro *T. theileri*-like, která odpovídá vysokým prevalencím detekovaným také u jiných studií. Například v Polsku dosahovala prevalence 33,7 %, v Rusku 31 % a u ovádů v Africe 49,2 % (Votýpka et al. 2015, Ganyukova et al. 2018; Werszko et al. 2019). Ovádi byli dříve potvrzeni jako přenašeči *T. theileri* (Böse et al. 1987), vysoká prevalence detekovaná během naší studie naznačuje významnou roli ovádů v přenosu *T. theileri*-like na studovaných lokalitách. Na kinetoplastida bylo PCR pozitivních celkem 60 % ovádů (15/25). Pravděpodobně z důvodu smíšených infekcí nevyšla u všech pozitivních vzorků sekvenace. Klonování by mohlo potvrdit případné smíšené infekce, které byly odhaleny u ovádů také ve studii Ganyukova et al. (2018).



## 5.2. Komáři a flebotomové jako potencionální přenašeči *T. theileri*

V této práci byly pro membránové sání využity tři druhy komárů. První volbou byli komáři rodu *Culex*, jejichž stálé chovy máme na katedře parazitologie. *Culex pipiens molestus* a *Cx. p. quinquefasciatus* byli po sání uchováváni v různých teplotách, aby byla ovlivněna doba trávení krve ve střevě (Benková a Volf 2007; Hlaváčová et al. 2013; McCue et al. 2016), kdy parazit získává více času na uchycení, vývoj a možnost uniknout tak defekací, při které by mohl být vyloučen z přenašeče (Githeko et al. 2000; Gage et al. 2008; Hlaváčová et al. 2013; Reinhold et al. 2018). Nižší teplota, ale neovlivňuje pouze rychlost trávení krve ve střevě, ale má vliv i na samotný vývoj parazitů. Při nižších teplotách dochází ke zpomalení vývoje, a infekční stádia vznikají později (Asin a Catalá 1995; Hlaváčová et al. 2013). Experimenty s komáry uchovávanými v 21 °C nepřinesly pozitivní výsledky, zatímco při využití nízkých teplot 8 – 11 °C byly detekovány střední a slabé infekce. Podle výsledků z vyšších teplot komáři rodu *Culex* pravděpodobně nehrají roli v přenosu, ale v nižších teplotách se trypanosomy mohou ve střevě udržet. To naznačuje i náš nález trypanosom *T. theileri*-like při pitvách *Cx. pipiens*, u kterého ve střevě byla pozorována silná infekce.

*Aedes aegypti* byl vybrán pro membránové sání, jelikož detekce *T. theileri*-like u komárů odchycených v terénu ukazovaly výskyt těchto trypanosom především u rodu *Aedes*. Pro experimentální sání s *Ae. aegypti* bylo využito několik izolátů s různým původem. Silné infekce s vysokou prevalencí 47 – 90 % byly detekovány při sání s izoláty pocházejících z komárů *Cul. annulata* (CUL46, CUL59) a *Ae. vexans* (CUL107). Při mikroskopii vybraných infekcí se ukázalo, že se zde tvoří infekční stádia trypanosom, jako bylo popsáno u infekcí ovčích klošů nebo ovádů *T. theileri*-like (Hoare 1972e; Molyneux 1975; Molyneux et al. 1978; Böse a Heister 1993). Je tedy pravděpodobné, že komáři rodu *Aedes* mohou potenciálně hrát roli při přenosu trypanosom skupiny *T. theileri*, avšak mohlo by se jednat jen o některé genotypy *T. theileri*-like, jak bude ještě dále podrobněji diskutováno.

Infekční experimenty s izolátem z ováda *Hy. ciureai* (TAB1) přinesly různorodé výsledky. Při prvním sání všichni komáři byli negativní a při druhém experimentu bylo 4/51 komárů pozitivních se slabými a středně silnými infekcemi. Oproti infekcím s izoláty pocházejících z komárů lze spíše usuzovat, že by mohlo docházet k vývoji jen ojediněle. Pro jednoznačné závěry u tohoto izolátu by bylo potřeba provést další



experimenty. Zejména srovnání s membránovým sáním s ovády by bylo zajímavé, nicméně chovy ovádů nejsou dostupné.

Infekce trypanosomami *T. melophagium* pocházejícími z ovčího kloše (MOVII) a *T. theileri*-like z jelení krve (CELA1) se neuchytila ve střevě komárů *Ae. aegypti*. U *T. melophagium* se tak potvrzuje vektorová specifita, jak bylo popisováno již dříve (Hoare 1972e).

Ve fylogenetické analýze je zřejmé, že komáří izoláty, které přinesly pozitivní infekce při experimentech, spadají společně do jedné skupiny v linii TthII (skupina sekvencí v bílém obdélníku na obrázku 4.10). Izoláty MOVII a TAB1 se nacházejí taktéž v linii TthII, ale jsou odlišné jak mezi sebou, tak se rovněž odlišují od izolátů pocházejících z komárů. Izolát z jelení krve (CELA1), který měl negativní výsledky infekčních experimentů, spadá do skupiny TthI, a tím se od ostatních použitých izolátů nejvíce odlišuje. To poukazuje, že některé genotypy by mohly být vektorově specifické s odlišnými přenašeči. Podobně byla vektorová specifita pozorována také u ptačích trypanosom (Votýpka et al. 2012; Zídková et al. 2012; Svobodová et al. 2017; Svobodová a Rádrová 2018).

Zajímavým experimentem pro porovnání by mohlo být membránové sání s izolátem CUL117 (*Aedes* sp.), který se od námi použitých kultur pro experimenty fylogeneticky velmi liší a spadá mimo definované linie z jiných publikací. Dalo by se předpokládat, že vhodnými přenašeči těchto trypanosom by mohli být komáři, neboť větev s tímto izolátem obsahuje pouze sekvence získané z komárů.

Při studiu prediureze infikovaných komárů se ukázalo, že trypomastigot/amastigot-like trypanosomy jsou přítomné i v moči. Přítomnost infekčních stádií u trypanosomatid ve vylučované moči byla pozorována taktéž u flebotomů (Sádlová a Volf 1999). Kdyby komáři hráli roli v přenosu, dalo by se předpokládat, že přenos na hostitele by mohl probíhat i díky prediurezi, kdy se trypanosomy mohou dostat na sliznici, či do oděrky (Böse et al. 1987). Tento způsob přenosu byl popsán taktéž u ptačích trypanosom, kdy byl prokázán přenos skrze spojivku (Votýpka a Svobodová 2004).

Calzolari et al. (2018) našli *T. theileri* ve flebotomovi *P. perfiliowi* v zadním střevě, proto jsme se rozhodli zkusit využít flebotomy k experimentálnímu sání. Infekce proběhly dvakrát s izolátem z *Culiseta annulata* a v obou případech byly detekovány i silné infekce s prevalencí kolem 65 %. Trypanosomy se tedy dokážou ve střevě *P. perniciosus* udržet a tvořit tam další vývojová stádia. Pro více informací by bylo dobré

detekovat stejná infekční stádia metacyklických trypomastigotů, která byla popsána při infekcích v ovádech či kloších (Hoare 1972e; Molyneux 1975; Molyneux et al. 1978; Böse a Heister 1993). Dále by bylo vhodné vyzkoušet více izolátů s různým původem, které byly využity při sání s komáry.

### **5.3. Infekce laboratorních komárů a myší**

Pozitivní střeva komárů a flebotomů se silnými infekcemi byla využita pro nákazu laboratorní myších. Negativní testy pomocí kultivace i xenodiagnostiky potvrzují hypotézu, že je *T. theileri*-like vysoce hostitelsky specifická, jak bylo zmíněno již dříve (Hoare 1972e; Dirie et al. 1990).

### **5.4. Vyšetřování krve jelenovité zvěře**

*T. theileri*-like byla detekována pouze ve dvou krevních vzorcích, ze kterých byla vykultivována. Tyto kultury byly izolovány naším týmem v minulých letech, během mé práce při detekci trypanosom nebyli bičíkovci detekováni při PCR ani při kultivaci v krvi jelenovitých. Obtížná detekce trypanosom *T. theileri*-like z krve byla prokázána již v minulosti kvůli nízké parazitémii v krvi hostitelů (Hoare 1972f; Neumuller et al. 2012).

### **5.5. Fylogenetická analýza**

Fylogenetická analýza získaných sekvencí představila vysokou variabilitu našich sekvencí. V analýze se ukázalo, že naše izoláty spadají jednak do obou dříve popsaných linií TthI a TthII (Rodrigues et al. 2003, Rodrigues et al. 2006; Rodrigues et al. 2010a), a navíc tvoří další větev odlišnou od těchto linií společně s izoláty pocházející ze Spojených států. Odlišnost těchto izolátů od definovaných linií byla naznačena i u jiných fylogenetických studií (Fisher et al. 2013; Garcia et al. 2020). U izolátů z USA existují sekvence pouze SSU rRNA, která je méně variabilní a nedokáže zcela odhalit genetickou variabilitu v rámci skupiny trypanosom *T. theileri*, a proto nebyla zatím tato linie detailněji prozkoumána (Rodrigues et al. 2010a; Garcia et al. 2011a; Garcia et al. 2011b; Fisher et al. 2013). Nicméně i analýza SSU rRNA ukazuje variabilitu našich izolátů, jak mezi sebou, tak i ve srovnání se sekvencemi z databáze.

Infekční experimenty s různými rody komárů a izoláty s různým původem naznačují, že by jednotlivé genotypy mohly být vektorově specifické. Stejně tak ve fylogenetickém stromě jsou některé větve tvořeny našimi sekvencemi pocházejícími pouze z komárů či muchniček. Tyto větve tedy naznačují, že by mohla existovat

vektorová specifita genotypů. Nicméně jsou větve, které jsou tvořeny jak genotypy z ovádů, muchniček, tak i z jeleních klošů. Některé sekvence byly získány pouze PCR detekcí, a proto nelze prokázat, zda *T. theileri* nebyla nasáta s krví bez pozdějšího vývoje, obzvláště u klošů *Lipoptena*, kteří po nalezení svého hostitele neopouštějí a opakovaně na něm sají. Zařazením studovaných sekvencí mezi genotypy se známými vektory nám může pomoci odhalit pravděpodobnost přenosu určitým vektorem. Přesto je však potřeba roli vektora potvrdit infekčními pokusy a dalšími experimenty.

Většina našich sekvencí spadá mimo linii TthI. To naznačuje, že na daných lokalitách se vyskytují zejména trypanosomy spadající mimo tuto linii. Tento jev může ale být způsoben i tím, že naše izoláty pochází především z komárů. V případě, že by byla *T. theileri*-like specifická na přenašeče, nemusely by být další genotypy *T. theileri*-like na daných lokalitách detekovány. Specifita na přenašeče byla popsána u ptačích trypanosom, jak bylo zmíněno již dříve (Votýpka et al. 2012; Zídková et al. 2012; Svobodová et al. 2017; Svobodová a Rádrová 2018). V linii TthI se vyskytují čtyři naše komáří izoláty, které byly zpracovávány pouze PCR detekcí, z čehož u tří jedinců byla při determinaci do druhu viditelná přítomnost krve v zadečku. Proto nelze vyloučit, že trypanosomy byly sice v krvi přítomné, ale vývoj ve střevě nemusel probíhat. Nevnímavost komárů této linie dále potvrzuje, že při experimentálním sání s jelením izolátem CELA1 nebyli komáři infikováni. Bylo zjištěno, že na lokalitách Mikulov i Doupov jsou přítomné trypanosomy z linie TthI, z níž bylo získáno pouze několik sekvencí. Pro prohloubení znalostí této linie na daných lokalitách by mohla pomoci detekce *T. theileri*-like u dalšího krevsajícího hmyzu.

Z fylogenetického stromu vyplývá, že genetická variabilita není závislá na lokalitách a větve jsou tvořeny sekvencemi pocházejícími z různých lokalit. To potvrzuje, že trypanosomy skupiny *T. theileri* vytváří odlišné genotypy, které nejsou závislé na geografickém výskytu (Rodrigues et al. 2006; Garcia et al. 2011a; Garcia et al. 2011b; Jaimes-Dueñez et al. 2018; Sukanuma et al. 2019).

Porovnáním našich sekvencí se sekvencemi z databáze lze vidět, že izoláty pocházející z dobytka a buvolů se odlišují od našich sekvencí, které tvoří odlišné větve v linii TthI a TthII. Námi získané sekvence, nepočítaje *T. melophagium*, jsou nejvíce příbuzné se sekvencemi pocházejícími z různých jelenovitých, nebo s izoláty z krevsajícího hmyzu, což naznačuje právě roli tohoto hmyzu jako přenašečů mezi jelenovitými. Nicméně ve fylogenetickém stromě lze pozorovat i větve se sekvencemi, které pocházejí z jelenovitých a odlišují se od našich izolátů.

Získané izoláty *T. melophagium* tvoří společnou větev s evropskými sekvencemi *T. melophagium*, avšak nově publikované sekvence pocházející z Mexika se odlišují a ukazují na genetickou variabilitu, která nebyla zatím u ovčích trypanosom popsána (Gibson et al. 2010; Garcia et al. 2011b; Martinković et al. 2012; Fisher et al. 2013).

Porovnáním sekvencí z pozitivních střev s kulturami získaných z jednoho jedince bylo detekováno celkem pět smíšených infekcí *T. theileri*. Dvě z těchto infekcí byly zahrnuty do fylogenetické analýzy, která ukázala odlišnost těchto izolátů navzájem. Obě sekvence pocházející z komára *Ae. annulipes* spadají do linie TthII, ale leží v různých větvích. Sekvence z ováda pocházející z *Hy. ciureai* spadají do odlišných linií. Tyto smíšené infekce byly zaznamenány u ovádů i v jiných studiích (Ganyukova et al. 2018; Werszko et al. 2019). Smíšené infekce nám ukazují, že na lokalitě Milovického lesa a v jeho okolí cirkuluje více genotypů *T. theileri*, kterými se může vektor nakazit. Pitva prokázala, že trypanosomy byly ve střevě uchycené a nejednalo se tedy o záchyt parazitů v nasáté krvi.

Fylogenetická analýza našich sekvencí byla provedena na základě SSU rRNA. Přestože není zcela vhodným genem pro objevování genetické variability u trypanosom *T. theileri* (Rodrigues et al. 2010; Garcia et al. 2011a; Garcia et al. 2011b; Fisher et al. 2013), můžeme vidět, že získané sekvence ukazují vysokou variabilitu a odlišnost od sekvencí z databáze. Gen malé ribosomální podjednotky byl použit pro detekci a fylogenetickou analýzu, jelikož v naší laboratoři byl pro tyto typy vzorků již používán. V databázi také existuje více sekvencí tohoto genu a poskytuje tedy dostatek dat pro porovnávání. Na základě vytvořeného fylogenetického stromu budou vybrány vzorky, u nichž bude provedena sekvenace variabilnějšího genu (ITS, gGAPDH nebo SL) pro odhalení detailnější genetické variability našich sekvencí.

## 6. SHRnutí

- Trypanosomy skupiny *T. theileri* byly detekovány u 13 druhů komárů, dvou druhů ovádů (*Hy. ciureai* a *T. bromius*) a jeleního kloše *L. fortisetosa*.
- *Trypanosoma melophagium* byla detekována na jedné ze šesti vyšetřovaných lokalit s prevalencí 68 % na dané lokalitě.
- Infekční sání s komáry rodu *Culex* potvrdilo vliv teploty při trávení krve na udržení infekce.
- Membránové sání s *Ae. aegypti* bylo úspěšné u izolátů pocházející z komárů, kde prevalence dosahovala od 47 – 91 %.
- Při membránovém sání flebotomů *P. perniciosus* s komářím izolátem infekce dosahovaly vysoké prevalence až 68 %.
- Infekční stádia trypanosom byla pozorována při pitvách komárů z experimentálního sání, pitvách odchycených ovádů a při experimentech prediureze u infikovaných komárů.
- Fylogenetická analýza odhalila genetickou různorodost našich sekvencí, které spadají do obou definovaných linií a potvrdila existenci skupiny odlišné od linií TthI a TthII.

## 7. ZÁVĚR

V České republice byla *T. theileri*-like detekována na všech vybraných lokalitách, především u komárů rodu *Aedes*, kdy u některých druhů dosahovala hodnota MIR až 21 %. Pomocí experimentů se podařilo odhalit, že v komárech dochází k množení a tvorbě infekčních stádií trypanosom, a přestože je kvůli vysoké hostitelské specifitě obtížné dokončit životní cyklus v laboratoři a potvrdit tak přenašeče těchto trypanosom, ukazuje se, že komáři mají potenciál být vektory *T. theileri*-like.

Kromě komárů byla *T. theileri*-like nově detekována u klošů druhu *L. fortisetosa*. U tohoto hmyzu je stále prostor pro výzkum jejich role v přenosu savčích trypanosom. Nízké prevalence (4 %) a způsob života jeleních klošů naznačuje, že by sice mohli být přenašeči, ale tato role by nebyla významná.

Do této doby byly fylogenetické studie *T. theileri*-like založeny především na izolátech z hostitelů a ovádů. Tato práce rozšiřuje množství sekvencí o izoláty z komárů, jeleních klošů a muchniček. Ve fylogenetické analýze byla odhalena větev *T. theileri*-like, která se liší od dosud popsáných linií TthI a TthII. To ukazuje, že genetická diverzita trypanosom skupiny *T. theileri* bude mnohem širší, než bylo doposud publikováno.

## 8. LITERATURA

- Adl, S. M., A. G. B. Simpson, M. A. Farmer, R. A. Andersen, O. R. Anderson, J. R. Barta, S. S. Bowser, G. Brugerolle, R. A. Fensome, S. Fredericq, T. Y. James, S. Karpov, P. Kugrens, J. Krug, C. E. Lane, L. A. Lewis, J. Lodge, D. H. Lynn, D. G. Mann, R. M. Mccourt, L. Mendoza, Ø. Moestrup, S. E. Mozley-Standridge, T. A. Nerad, C. A. Shearer, A. V. Smirnov, F. W. Spiegel a M. F. J. R. Taylor (2005):** The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52 (5): 399 – 451.
- Amato, B., F. Mira, V. Di Marco Lo Presti, A. Guercio, L. Russotto, F. Gucciardi, M. Vitale, A. Lena, G. R. Loria, R. Puleio, V. Cannella (2019):** A case of bovine trypanosomiasis caused by *Trypanosoma theileri* in Sicily, Italy. *Parasitology Research*, 118: 2723 – 2727.
- Asin, S. a S. Catalá (1995):** Development of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans*: influence of temperature and blood consumption. *The Journal of Parasitology*, 81 (1): 1 – 7.
- Benková, I. a Petr Volf (2007):** Effect of temperature on metabolism of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae). *Entomological Society of America*, 44 (1): 150 – 154.
- Bigalke, R. D., M. E. Keep a J. H. Schoeman (1972):** Some protozoan parasites of tragelaphine antelopes in south Africa with special reference to a *Babesia* sp. in a bushbuck and a *Trypanosoma theileri*-like parasite in a nyala. *Onderstepoort journal of veterinary research*, 39 (4): 225 – 227.
- Böhm, M., P. C. L. White, J. Chambers, L. Smith a M. R. Hutchings (2007):** Wild deer as a source of infection for livestock and humans in the UK. *The Veterinary Journal*, 174: 260 – 276.
- Börstler, J., H. Jöst, R. Garms, A. Krüger, E. Tannich, N. Becker, J. Schmidt-Chanasit a R. Lühken (2016):** Host-feeding patterns of mosquito species in Germany. *Parasites and Vectors*, 9 (1): 1 – 14.
- Böse, R., K. T. Friedhoff a S. Olbrich (1987):** Transmission of *Megatrypanum* Trypanosomes to *Cervus dama* by Tabanidae. *The Journal of Protozoology*, 34 (1): 110 – 113.

- Böse, R., a K. Petersen (1991):** *Lipoptena cervi* (Diptera), a potencial vector of *Megatrypanum* trypanosomes of deer (Cervidae). *Parasitology Research*, 77: 723 – 725.
- Böse, R. a N. C. Heister (1993):** Development of *Trypanosoma (M.) theileri* in Tabanids. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 40 (6): 788 – 792.
- Böse, R., K. Petersen, H. Pospichal, N. Buchanan a A. Tait (1993):** Characterization of *Megatrypanum* trypanosomes from European Cervidae. *Parasitology*, 107: 55 – 61.
- Braun, U., E. Rogg, M. Walser, D. Nehrbass, F. Guscetti, A. Mathis a P. Deplazes (2002):** *Trypanosoma theileri* in the cerebrospinal fluid and brain of a heifer with suppurative meningoencephalitis. *Veterinary Record*, 150: 18 – 19.
- Briegel, H. a L. Rezzonico (1985):** Concentration of host blood protein during feeding by anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 22 (6): 612 – 618.
- Calzolari, M., G. Rugna, E. Clementi, E. Carra, M. Pinna, F. Bergamini, M. Fabbi, M. Dottori, L. Sacchi a J. Votýpka (2018):** Isolation of a trypanosome related to *Trypanosoma theileri* (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) from *Phlebotomus perfiliewi* (Diptera: Psychodidae). *BioMed Research International*, 2018.
- Chvála, M., K. Hůrka, J. Chalupský, J. Knoz, J. Minář a I. Országh (1980a):** Hippoboscidae - Klošovité. *Fauna ČSR, svazek 22, Krevsající mouchy a střechci*, 475 – 478. Nakladatelství československé akademie věd.
- Chvála, M., K. Hůrka, J. Chalupský, J. Knoz, J. Minář a I. Országh (1980b):** Tabanidae - Ovádovití. *Fauna ČSR, svazek 22, Krevsající mouchy a střechci*, 282 – 390. Nakladatelství československé akademie věd.
- Clark, G. G. (1972):** Trypanosomes from mule deer in New Mexico and Colorado. *Journal of Wildlife Diseases*, 8 (4): 325 – 326.
- Cross, R. F., C. K. Smith a D. R. Redman (1971):** Observations on *Trypanosoma theileri* infection in cattle. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 35 (1): 12 – 17.



- Davidson, W. R., C. B. Crow, J. M. Crum a Robert R. Gerrish (1983):** Observations on *Theileria cervi* and *Trypanosoma cervi* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) from the southeastern United States. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 50 (1): 165 – 169.
- Davies, R. B. a G. G. Clark (1974):** Trypanosomes from elk and horse flies in New Mexico. *Journal of Wildlife Diseases*, 10: 63 – 65.
- Dirie, M. F., S. Bornstein, K. R. Wallbanks, J. K. Stiles a D. H. Molyneux (1990):** Zymogram and life-history studies on trypanosomes of the subgenus *Megatrypanum*. *Parasitology Research*, 76: 669 – 674.
- Doherty, M. L., H. Windle, H. P. Voorheis, H. Larkin, M. Casey, D. Clery a M. Murray (1993):** Clinical disease associated with *Trypanosoma theileri* infection in a calf in Ireland. *The Veterinary record*, 132 (26): 653 – 56.
- Ducháč, V., V. Bádr (1998):** Několik poznámek k druhu *Lipoptena fortisetosa* (Diptera: Hippoboscidae). *Vč. sb. přír. – Práce a studie*, 6 (1998): 117-122.
- Fisher, A. C., G. Schuster, W. J. Cobb, A. M. James, S. M. Cooper, A. A. Pérez de León a P. J. Holman (2013):** Molecular characterization of *Trypanosoma* (*Megatrypanum*) spp . infecting cattle (*Bos taurus*), white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*), and elk (*Cervus elaphus canadensis*) in the United States. *Veterinary Parasitology*, 197 (1 – 2): 29 – 42.
- Friedhoff, K. T., J. Petrich, M. Hoffmann a G. Büscher (1984):** Trypanosomes in Cervidae in Germany. *Zentralblatt Fur Bakteriologie, Mikrobiologie Und Hygiene Series a-Medical Microbiology Infectious Diseases Virology Parasitology*, 256 (3): 286 – 287.
- Gage, K. L., T. R. Burkot, R. J. Eisen a E. B. Hayes (2008):** Climate and vectorborne diseases. *American Journal of Preventive Medicine*, 35 (5): 436 – 450.
- Ganyukova, A. I., A. V. Zolotarev, M. N. Malysheva a A. O. Frolov (2018):** First record of *Trypanosoma theileri*-like flagellates in horseflies from Northwest Russia. *Protistology*, 12 (4): 223 – 30.

- Garcia, H. A., K. Kamyngkird, A. C. Rodrigues, S. Jittapalapong, M. M. G. Teixeira a M. Desquesnes (2011a):** High genetic diversity in field isolates of *Trypanosoma theileri* assessed by analysis of cathepsin L-like sequences disclosed multiple and new genotypes infecting cattle in Thailand. *Veterinary Parasitology*, 180 (3 – 4): 363 – 367.
- Garcia, H. A., A. C. Rodrigues, F. Martinkovic, A. H. H. Minervino, M. Campaner, V. L. B. Nunes, F. Paiva, P. B. Hamilton a M. M. G. Teixeira (2011b):** Multilocus phylogeographical analysis of *Trypanosoma (Megatrypanum)* genotypes from sympatric cattle and water buffalo populations supports evolutionary host constraint and close phylogenetic relationships with genotypes found in other ruminants. *International Journal for Parasitology*, 41 (13 – 14): 1385 – 1396.
- Garcia, H. A., P. A. Blanco, A. C. Rodrigues, C. M. F. Rodrigues, C. S. A. Takata, M. Campaner, E. P. Camargo a M. M. G. Teixeira (2020):** Pan-american *Trypanosoma (Megatrypanum) trinaperronei* n. sp. in the white-tailed deer *Odocoileus virginianus* Zimmermann and its deer ked *Lipoptena mazamae* Rondani, 1878: morphological, developmental and phylogeographical characterisation. *Parasites & Vectors*, 13 (1): 308.
- Gee, J. D. (1975):** The control of diuresis in the tsetse fly *Glossina austeni*: a preliminary investigation of the diuretic hormone. *Journal of Experimental Biology*, 63 (2): 391 – 401.
- Gibson, W, J. G. Pilkington a J. M. Pemberton (2010):** *Trypanosoma melophagium* from the sheep ked *Melophagus ovinus* on the island of St Kilda. *Parasitology*, 137 (12): 1799 – 1804.
- Githeko, A. K., S. W. Lindsay, U. E. Confalonieri a J. A. Patz (2000):** Climate change and vector-borne diseases: A regional analysis. *Bulletin of the World Health Organization*, 78 (9): 1136 – 1147.
- Greco, A., G. R. Loria, S. Dara, T. Luckins a O. Sparagano (2000):** First isolation of *Trypanosoma theileri* in sicilian cattle. *Veterinary Research Communications*, 24 (7): 471 – 475.
- Hall, T. (2011):** BioEdit: An important software for molecular biology. *GERF Bulletin of Biosciences*, 2 (1): 60 – 61.

- Hamilton, P. B., W. C. Gibson a J. R. Stevens (2007):** Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44 (1): 15 – 25.
- Hatama, S., T. Shibahara, M. Suzuki, K. Kadota, I. Uchida a T.Kanno (2007):** Isolation of a *Megatrypanum* trypanosome from sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) in Japan. *Veterinary Parasitology*, 149 (1 – 2): 56 – 64.
- Hlaváčová, J., J. Votýpka a P. Volf (2013):** The effect of temperature on *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) development in sand flies. *Entomological Society of America*, 50 (5): 955 – 958.
- Hoare, C. A. (1964):** Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes. X. revision of the systematics. *The Journal of Protozoology*, 11 (2): 200–207.
- Hoare, C. A. (1972a):** The Stercoraria: subgenus *Megatrypanum* Hoare, 1964. *The trypanosomes of mammals: A zoological monograph*, 123 – 125. Blackwell Scientific Publications Oxford and Edinburgh.
- Hoare, C. A. (1972b):** *Theileri*-like trypanosomes from ruminants. *The trypanosomes of mammals*, 141 – 151. Blackwell Scientific Publications Oxford and Edinburgh.
- Hoare, C. A. (1972c):** *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* Laveran, 1902 - Life cycle and morphology. *The trypanosomes of mammals*, 128 – 137. Blackwell Scientific Publications Oxford and Edinburgh.
- Hoare, C. A. (1972d):** *Trypanosoma (Megatrypanum) mazamarum* Mazza, Romaña a Fiora, 1932. *The trypanosomes of mammals*, 152. Blackwell Scientific Publications Oxford and Edinburgh.
- Hoare, C. A. (1972e):** *Trypanosoma (Megatrypanum) melophagium* (Flu, 1908) Noller, 1917. *The trypanosomes of mammals: A zoological monograph*, 152 – 167. Blackwell Scientific Publications Oxford and Edinburgh.
- Hoare, C. A. (1972f):** *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* Laveran, 1902. *The trypanosomes of mammals*, 125 – 141. Blackwell Scientific Publications Oxford and Edinburgh.

- Hoare, C. A. (1972g):** *Trypanosoma (Megatrypanum) theodori* Hoare, 1931. *The trypanosomes of mammals: A zoological monograph*, 167 – 171. Blackwell Scientific Publications Oxford and Edinburgh.
- Hoffmann, M., G. Buscher a K. T. Friedhoff (1984):** Stercorarian trypanosomes from deer (Cervidae) in Germany. *The Journal of Protozoology*, 31 (4): 581 – 584.
- Jaimes-Dueñez, J., O. Triana-Chávez a A. M. Mejía-Jaramillo (2018):** Spatial-temporal and phylogeographic characterization of *Trypanosoma* spp. in cattle (*Bos taurus*) and buffaloes (*Bubalus bubalis*) reveals transmission dynamics of these parasites in Colombia. *Veterinary Parasitology*, 249 (52): 30 – 42.
- Jones, J. C. a E. Brandt (1981):** Fluid excretion by adult *Aedes aegypti* mosquitoes. *Journal of Insect Physiology*, 27 (8): 545 – 549.
- Katoh, K., K. Misawa, K. I. Kuma, a T. Miyata (2002):** MAFFT: A novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30 (14): 3059 – 3066.
- Kearse, M., R. Moir, A. Wilson, S. Stones-Havas, M. Cheung, S. Sturrock, S. Buxton, A. Cooper, S. Markwitz, C. Duren, T. Thierer, B. Ashton, P. Meintjes a A. Drummond (2012):** Geneious basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28 (12): 1647 – 1649.
- Kingston, N., J. K. Morton a M. Matthews (1975):** Trypanosomes from mule deer, *Odocoileus hemionus*, in Wyoming. *Journal of Wildlife Diseases*, 11 (4): 519 – 521.
- Kingston, N. a J. K. Morton (1975):** *Trypanosoma cervi* sp. n. from elk (*Cervus canadensis*) in Wyoming. *The Journal of Parasitology*, 61 (1): 17 – 23.
- Kingston, N., E. T. Thorne, G. M. Thomas, L. McHolland a M. S. Trueblood (1981):** Further studies on trypanosomes in game animals in Wyoming II. *Journal of Wildlife Diseases*, 17 (4): 539 – 546.
- Kingston, N. a B. Bobek (1985):** A trypanosome in roe deer, *Capreolus capreolus*, in Southern Poland. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 52 (1): 143.

- Kingston, N., J. Drózd a M. Rutkowska (1985):** *Trypanosoma* sp. in red deer (*Cervus elaphus*) and elk (*Alces alces*) in Poland. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 52 (1): 144 – 145.
- Kingston, N., A. Franzmann, a L. Maki (1985):** Redescription of *Trypanosoma cervi* (protozoa) in moose, *Alces alces*, from Alaska and Wyoming. *Journal of the Helminthological Society of Washington*, 52 (1): 54 – 59.
- Kingston, N., B. Bobek, K. Perzanowski, I. Wita a L. Maki (1992):** Description of *Trypanosoma (Megatrypanum) stefanskii* sp. n. from roe deer (*Capreolus capreolus*) in Poland. *Journal of the Helminthological Society of Washington*, 59 (1): 89 – 95.
- Kistner, T. P. a W. L. Hanson (1969):** Trypanosomiasis in white-tailed deer. *Wildlife Disease Association*, 5 (4): 398 – 399.
- Kramář, J. (1958):** *Fauna ČSR, svazek 13, Komáři bodaví – Culicinae*. Nakladatelství československé akademie věd.
- Krinsky, William L. a L. L. Pechuman (1975):** Trypanosomes in horse flies and deer flies in central New York State. *The Journal of Parasitology*, 61 (1): 12–16.
- Krinsky, W. L. a W. Burgdorfer (1976):** Trypanosomes in *Amblyomma americanum* from Oklahoma. *The Journal of Parasitology*, 62 (5): 824 – 825.
- Lanevski-Pietersma, A., O. Ogunremi a A. Desrochers (2004):** Parasitemia in a neonatal bison calf. *Veterinary Clinical Pathology*, 33 (3): 173 – 176.
- Latif, A. A., M. A. Bakheit, A. E. Mohamed a E. Zweygarth (2004):** High infection rates of the tick *Hyalomma anatolicum anatolicum* with *Trypanosoma theileri*. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 71 (4): 251 – 256.
- Lawyer, P., M. Killick-kendrick, T. Rowland, E. Rowton a P. Volf (2017):** Laboratory colonization and mass rearing of phlebotomine sand flies. *Parasite*, 42 (24): 1 – 39.
- Lee, Y. F., C. C. Cheng, J. S. Chen, N. N. Lin, Y. W. Hung, J. M. Wang, W. Ch. Tu, K. C. Tung a Y. T. Chiu (2013):** Evidence of intracellular stages in *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* in non-phagocytic mammalian cells. *Veterinary Parasitology*, 191 (3 – 4): 228 – 239.

- Maddrell, S. H. (1964).):** Excretion in the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus* Stal. I. The control of diuresis. *The Journal of experimental biology*, 41: 163–76.
- Martinković, F., K. Matanović, A. C. Rodrigues, H. A. Garcia a M. M. G. Teixeira (2012):** *Trypanosoma (Megatrypanum) melophagium* in the sheep ked *Melophagus ovinus* from organic farms in Croatia: phylogenetic inferences support restriction to sheep and sheep keds and close relationship with trypanosomes from other ruminant species. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 59 (2): 134 – 44.
- Martins, J. R., R. C. Leite a R. L. Doyle (2008):** Tripanosomatides like *Trypanosoma theileri* in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 17 (2): 113 – 114.
- Maslov, D. A., J. Lukeš, M. Jirků a L. Simpson (1996):** Phylogeny of trypanosomes as inferred from the small and large subunit rRNAs: implications for the evolution of parasitism in the trypanosomatid protozoa. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 75 (1996): 197 – 205.
- McCue, M. D., L. Boardman, S. Clusella-Trullas, E. Kleynhans a J. S. Terblanche (2016):** The speed and metabolic cost of digesting a blood meal depends on temperature in a major disease vector. *Journal of Experimental Biology*, 219 (12): 1893 – 1902.
- Medlin, L. K., H. J. Elwood, S. Stickel a M. L. Sogin (1988):** The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene*, 71: 491 – 499.
- Molyneux, D. H. (1975):** *Trypanosoma (Megatrypanum) melophagium*: Modes of attachment of parasites to mid-gut, hindgut and rectum of the sheep ked, *Melophagus ovinus*. *Acta Tropica*, 32 (1): 65 – 74.
- Molyneux, D. H., M. Selkirk a D. Lavin (1978):** *Trypanosoma (Megatrypanum) melophagium* in the sheep ked, *Melophagus ovinus*: a scanning electron microscope (SEM) study of the parasites and the insect gut wall surfaces. *Acta Tropica*, 35 (4): 319 – 328.
- Morzaria, A. P., A. A. Latif, F. Jongejan a A. R. Walker (1986):** Transmission of a *Trypanosoma* sp. to cattle by the tick *Hyalomma anatolicum anatolicum*. *Veterinary Parasitology*, 19: 13 – 21.

- Mulandane, F. C., L. P. Snyman, D. R. A. Brito, J. Bouyer, J. Fafetine, J. Van Den Abbeele, M. Oosthuizen, V. Delespaux a L. Neves (2020):** Evaluation of the relative roles of the Tabanidae and Glossinidae in the transmission of trypanosomosis in drug resistance hotspots in Mozambique. *Parasites and Vectors*, 13 (219): 1 – 16.
- Nalbantoğlu, S. a Z. Karaer (2008):** *Trypanosoma melophagium* in blood cell culture. *Ankara Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 55 (3): 173 – 176.
- Neumuller, M., K. Nilsson a C. Pahlson (2012):** *Trypanosoma* spp. in swedish game animals. *Parasitology Research*, 110 (1): 135 – 39.
- Ngomtcho, S. C. Henriette, J. S. Weber, E. N. Bum, T. T. Gbem, S. Kelm a M. D. Achukwi (2017):** Molecular screening of tsetse flies and cattle reveal different *Trypanosoma* species including *T. grayi* and *T. theileri* in northern Cameroon. *Parasites and Vectors*, 10 (1): 1 – 16.
- Nijhout, H. F. a M. Carrow Grant (1978):** Diuresis after a bloodmeal in female *Anopheles freeborni*. *Journal of Insect Physiology*, 24: 293 – 298.
- Paaijmans, K. P., S. Blanford, B. H. K. Chan a M. B. Thomas (2012):** Warmer temperatures reduce the vectorial capacity of malaria mosquitoes. *Biology Letters*, 8 (3): 465 – 468.
- Pacheco, T. D. A., A. M., A. Pereira da Costa, R. Witter, A. L. T. Melo, R. V. Boas, C. S. Chitarra, V. Dutra, L. Nakazato a R. de Campos Pacheco (2018):** Genetic diversity and molecular survey of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* in cattle in Brazil's western Amazon region. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 27 (4): 579 – 583.
- Page, R. D. M. (1996):** TreeView : an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Bioinformatics*, 12 (4): 357 – 358.
- Rádrová, J., V. Šeblová, a J. Votýpka (2013):** Feeding behavior and spatial distribution of *Culex mosquitoes* (Diptera: Culicidae) in wetland areas of the Czech Republic. *Journal of Medical Entomology*, 50 (5): 1097 – 1104.
- Rambaut, A. (2012):** FigTree v1.4. 2012.
- Rasband, W. S. (1997):** ImageJ. 1997.

- Reinhold, J. M., C. R. Lazzari a C. Lahondère (2018):** Effects of the environmental temperature on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes: A review. *Insects*, 9 (4).
- Rodrigues, A. C., M. C., C. S. A. Takata, A. Dell' Porto, R. V. Milder, G. F. Takeda, a M. M. G. Teixeira (2003):** Brazilian isolates of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: diagnosis and differentiation of isolates from cattle and water buffalo based on biological characteristics and randomly amplified DNA sequences. *Veterinary Parasitology*, 116 (3): 185 – 207.
- Rodrigues, A. C., F. Paiva, M. Campaner, J. R. Stevens, H. A. Noyes a M. M. G. Teixeira (2006):** Phylogeny of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology*, 132: 215 – 224.
- Rodrigues, A. C., H. A. Garcia, J. S. Batista, A. H. H. Minervino, G. Góes-Cavalcante, F. M. da Silva, R. C. Ferreira, M. Campaner, F. Paiva a M. M. G. Teixeira (2010a):** Characterization of spliced leader genes of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: phylogeographical analysis of brazilian isolates from cattle supports spatial clustering of genotypes and parity with ribosomal markers. *Parasitology*, 137 (1): 111 – 122.
- Rodrigues, A. C, H. A. Garcia, P. A. Ortiz, A. P. Cortez, F. Martinkovic, F. Paiva, J. S. Batista, A. H. Minervino, M. Campaner, E. M. Pral, S.C. Alfieri a M. M. G. Teixeira (2010b):** Cysteine proteases of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: Cathepsin L-like gene sequences as targets for phylogenetic analysis, genotyping diagnosis. *Parasitology International*, 59: 318 – 325.
- Sádlová, J., J. Reishig a P. Volf (1998):** Prediuresis in female *Phlebotomus* sandflies (Diptera: Psychodidae). *European Journal of Entomology*, 95 (4): 643 – 647.
- Sádlová, J. a P. Volf (1999):** Occurrence of *Leishmania major* in sandfly urine. *Parasitology*, 118 (5): 455 – 460.
- Schoener, E., S. S. Uebleis, C. Cuk, M. Nawratil, A. G. Obwaller, T. Zechmeister, K. Lebl, J. Rádrová a C. Zittra (2018):** Trypanosomatid parasites in Austrian mosquitoes. *PLoS one*, 13 (4): 1 – 15.



- Schönenberger, A. C., S. Wagner, H. C. Tuten, F. Schaffner, P. Torgerson, S. Furrer, A. Mathis a C. Silaghi (2016):** Host preferences in host-seeking and blood-fed mosquitoes in Switzerland. *Medical and Veterinary Entomology*, 30 (1): 39 – 52.
- Seifi, H. A. (1995):** Clinical trypanosomosis due to *Trypanosoma theileri* in a cow in Iran. *Tropical Animal Health and Production*, 27 (2): 93 – 94.
- Shastri, U. V. a P. D. Deshpande (1981):** *Hyalomma anatolicum anatolicum* (Koch, 1844) as a possible vector for transmission of *Trypanosoma theileri*, Laveran, 1902 in cattle. *Veterinary Parasitology*, 9: 151 – 155.
- Small, R. W. (2005):** A review of *Melophagus ovinus* (L.), the sheep ked. *Veterinary Parasitology*, 130: 141 – 155.
- Sood, N. K., L. D. Singla, R. S. Singh a S. K. Uppal (2011):** Association of *Trypanosoma theileri* with peritonitis in a pregnant cross-bred cow: a case report. *Veterinarni Medicina*, 56 (2): 82 – 84.
- Stamatakis, A. (2014):** RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30 (2014): 1312 – 1313.
- Stuht, J. N. (1975):** Morphology of trpanosomes from white-tailed deer and wapiti in Michigan. *Journal of Wildlife Diseases*, 11: 256 – 262.
- Suganuma, K., D. Kondoh, T. Sivakumar, D. Mizushima, A. T. M. Elata, O. M. M. Thekiso, N. Yokoyama a N. Inoue (2019):** Molecular characterization of a new *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* isolate supports the two main phylogenetic lineages of this species in Japanese cattle. *Parasitology Research*, 118 (6): 1927 – 1935.
- Svobodová, M., O. V. Dolnik, I. Čepička a J. Rádrová (2017):** Biting midges (Ceratopogonidae) as vectors of avian trypanosomes. *Parasites and Vectors*, 10 (224): 1 – 9.
- Svobodová, M. a J. Rádrová (2018):** Phlebotomine sandflies – potential vectors of avian trypanosome. *Acta Protozoologica*, 57 (1): 53 – 59.
- Talat, R., T. Khanum a A. Hayat (2005):** Studies on mammalian Haematozoan parasites of NWFP Pakistan. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 5 (8): 726 – 729.

- Vairamuthu, S., C. Balachandran, N. Pazhanivel, K. S. Kumar a M. Raman. (2011):** Occurrence of *Trypanosoma theileri* Laveran, 1902 in a Holstein Friesian cross-bred cow. *Indian Journal Of Animal Research*, 45 (4): 324 – 325.
- Villa, A., C. Gutierrez, E. Gracia, B. Moreno, G. Chacón, P. V. Sanz, P. Buscher a L. Touratier (2008):** Presence of *Trypanosoma theileri* in spanish cattle. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1149: 352 – 354.
- Volf, P., P. Horák a kolektiv (2007):** Parazitičtí členovci - morfologie a anatomie parazitických členovců. *Paraziti a jejich biologie*, 237 – 241. Triton.
- Volf, P. a V. Volfová (2011):** Establishment and maintenance of sand fly colonies. *Journal of Vector Ecology*, 36: 1 – 9.
- Votýpka, J. a M. Svobodová (2004):** *Trypanosoma avium*: Experimental transmission from black flies to canaries. *Parasitology Research*, 92 (2): 147 – 151.
- Votýpka, J., J. Szabová, J. Rádrová, L. Zídková a M. Svobodová (2012):** *Trypanosoma culicavium* sp. nov., an avian trypanosome transmitted by *Culex* mosquitoes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62: 745 – 54.
- Votýpka, J., J. Rádrová, T. Skalický, M. Jirků, D. Jirsová, A. D. Mihalca, G. D'Amico, K. J. Petrželková, D. Modrý a J. Lukeš (2015):** A tsetse and tabanid fly survey of African great apes habitats reveals the presence of a novel trypanosome lineage but the absence of *Trypanosoma brucei*. *International Journal for Parasitology*, 45 (12): 741 – 48.
- Votýpka, J., J. Brzoňová, J. Ježek a D. Modrý (2019):** Horse flies (Diptera: Tabanidae) of three west african countries: a faunistic update, barcoding analysis and trypanosome occurrence. *Acta Tropica*, 197 (2019): 1 – 8.
- Ward, W. H., M. W. M. Hill, I. D. Mazlin a C. K. Foster (1984):** Anaemia associated with a high parasitaemia of *Trypanosoma theileri* in a dairy cow. *Australian Veterinary Journal*, 61 (10): 324 – 324.
- Wells, E A. (1976):** Subgenus *Megatrypanum*. Lumsden, W. H. R.; Evans, *Biology of the Kinetoplastida*, (1): 257 – 275. Academic Press Books.

- Werszko, J., T. Szewczyk, Steiner-Bogdaszewska, P. Wróblewski, G. Karbowiak a Z. Laskowski (2019):** Molecular detection of *Megatrypanum* trypanosomes in tabanid flies. *Medical and Veterinary Entomology*.
- Yokoyama, N., T. Sivakumar, S. Fukushi, M. Tattiyapong, B. Tuvshintulga, H. Kothalawala, S. Susil, P. Silva, I. Igarashi a N. Inoue (2015):** Genetic diversity in *Trypanosoma theileri* from Sri Lankan cattle and water buffaloes. *Veterinary Parasitology*, 207 (3 – 4): 335 – 341.
- Zídková, L., I. Čepička, J. Szabová a M. Svobodová (2012):** Biodiversity of avian trypanosomes. *Infection, Genetics and Evolution*, 12: 102 – 112.

## 8.1. Sekundární citace

- Bequaert, J. (1942):** A monograph of the Melophaginae, or ked-flies, of sheep, goats, deer and antelopes (Diptera, Hippoboscidae). *Entomological Society of America*, 22.
- Deane, L. M. (1961):** Tripanosomídeos de mamíferos do região Amazonica. I. alguns flagelados encontrados no sangue de mamíferos silvestres. *Estado do Pará. Revista Instituição Medicina Tropical São Paulo*, 3: 15 – 28.

## 8.2. Odkazy internetových stránek

- Mapy České republiky, Slepá mapa krajů ČR* [online] - [cit. 2020-07-23]. Dostupné z (<http://www.mapaceskerepubliky.cz/slepa-mapa-cr>).